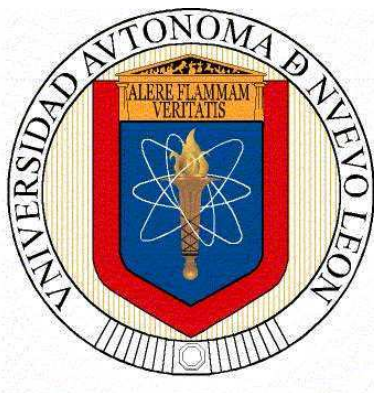


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

SUBDIRECCIÓN DE POSGRADO



**EFFECTO DE ESTRÉS INDUCIDO CON NaCl, Cu²⁺ y Fe²⁺ EN
BIOMASA, TIMOL, CARVACROL Y PROLINA EN ORÉGANO
MEXICANO (*Lippia graveolens* H.B.K.)**

Por

FRANCISCO JAVIER VALDÉS OYERVIDES

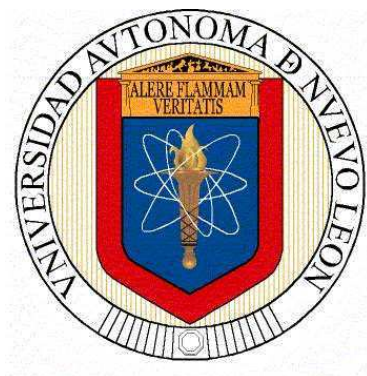
Como requisito parcial para obtener el Grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

Con acentuación en Química de Productos Naturales

SAN NICOLÁS DE LOS GARZA, N.L. JUNIO 2012

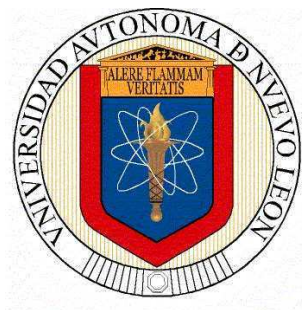
EFFECTO DE ESTRÉS INDUCIDO CON NaCl, Cu²⁺ y Fe²⁺ EN BIOMASA, TIMOL, CARVACROL Y PROLINA EN ORÉGANO MEXICANO (*Lippia graveolens* H.B.K.)



Dra. Catalina Rivas Morales
Director Interno

Dr. Adalberto Benavides Mendoza
Director Externo

EFFECTO DE ESTRÉS INDUCIDO CON NaCl, Cu²⁺ y Fe²⁺ EN BIOMASA, TIMOL, CARVACROL Y PROLINA EN ORÉGANO MEXICANO (*Lippia graveolens* H.B.K.)



Comité de Tesis

Dra. Catalina Rivas Morales Presidente

Dra. Catalina Leos Rivas Secretaria

Dra. Ma. Julia Verde StarVocal

Dra. Azucena Oranday Cárdenas Vocal

Dra. Ma. Adriana Núñez González Vocal

EFFECTO DE ESTRÉS INDUCIDO CON NaCl, Cu²⁺ y Fe²⁺ EN BIOMASA, TIMOL, CARVACROL Y PROLINA EN ORÉGANO MEXICANO (*Lippia graveolens* H.B.K)

Comité Académico Doctoral

Subdirector de Estudios de Posgrado

Dra. Diana Resendez Pérez

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Catalina Rivas Morales por su apoyo y confianza para realizar este trabajo, pero sobre todo por brindarme su amistad.

Dra. Ma. Adriana Núñez González por brindarme su amistad, su gran disponibilidad para orientarme e impulsarme en forma desinteresada, además de su valiosa asesoría en la realización de este trabajo.

Dra. Julia Verde Star por sus valiosos consejos y por su calidad humana y su asesoría en este trabajo.

A la Dra. Azucena Oranday Cárdenas, por su ayuda y asesoría para llevar a cabo este trabajo y la cordialidad con la que siempre me trataron.

Al Dr. Adalberto Benavides Mendoza. Por su participación en el diseño y seguimiento de este trabajo y por compartir conmigo sus conocimientos.

Al Dr. Valentín Robledo Torres por su valiosa colaboración en la realización de éste trabajo

A Víctor Manuel Zamora Villa, por su asesorías y apoyo en el trabajo estadístico

Al Dr. Víctor Reyes salas por sus consejos en el planteamiento y conducción de este trabajo,
pero sobre todo por su amistad

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio “Narro mi Alma mater “por haberme
otorgado las facilidades y presupuesto para realizar este trabajo.

A la T. L. Q. María Guadalupe Pérez Ovalle, por su valiosa colaboración en parte de los
análisis de laboratorio de esta tesis.

A Juan Manuel Ramírez Cerda, por el apoyo brindado en el manejo y toma de datos en las
plantas evaluadas en esta trabajo.

A mis compañeros maestros y personal administrativo del Departamento de Horticultura de
la UAAAN por su apoyo en este trabajo de investigación.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT, número de becario: 256654) por
el apoyo otorgado para la realización de mi doctorado.

A La Facultad de Biología de la Universidad Autónoma de Nuevo León por permitirme
realizar mi programa doctoral.

DEDICATORIA

A Dios y a mis padres Hildebrando y Ramona por haberme dado la vida y la oportunidad de formar una familia motor de mi existencia y deseo de superación

A mi amada esposa Laura por brindarme su amor, comprensión y paciencia por ser la piedra angular para mi superación moral, espiritual y profesional

A mis hijos Hildebrando, Francisco Javier y Manuel Santiago por ser la razón de mi existencia.

A mis nietos Hildebrando, Analy, Valeria y mis nueras Analy y Marisol por brindarme su cariño y respeto.

A mis hermanos y sus familias, Celia[†], M^a de los Ángeles, Jorge, Ramón, Antonio, Rafael, Jesús.

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
DIRECCIÓN DE TESIS	i
APROBACIÓN DE TESIS DOCTORAL POR EL COMITÉ DE TESIS	ii
APROBACIÓN DE TESIS POR EL COMITÉ ACADÉMICO DOCTORAL	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
DEDICATORIA	vi
TABLA DE CONTENIDO	vii
LISTA DE TABLAS	xi
LISTA DE FIGURAS	xiii
NOMENCLATURA	xv
1. RESUMEN Y ABSTRACT	1
2. INTRODUCCIÓN	3
3. HIPOTESIS	6
4. OBJETIVOS	6
4.1 Objetivos general	6
4.2 Objetivos particulares	7
5. ANTECEDENTES	8
5.1 Estrés en plantas	8
5.1.1 El concepto de estrés	8
5.1.2 Factores ambientales que causan estrés	10

5.1.3 Interrelaciones de Factores que inducen estrés	10
5.2 Déficit hídrico como factor inductor de estrés	12
5.3 Acumulación de prolina bajo estrés	15
5.4 Estrés de las plantas por salinidad	17
5.4.1 Efecto de sales en las plantas	20
5.5 Estrés por metales	26
5.5.1 El hierro	28
5.5.2 Cobre	30
5.5.3 Efecto de exceso de metales en plantas	32
5.6 Generalidades del orégano	38
5.6.1 El género <i>Lippia</i>	40
5.6.2 Nombres comunes de <i>L. graveolens</i>	41
5.6.3 Descripción botánica de <i>L. graveolens</i>	41
5.6.4 Fenología de <i>L. graveolens</i>	42
5.6.5 Clasificación taxonómica de <i>L. graveolens</i>	42
5.6.6 Hábitat de <i>L. graveolens</i>	43
5.6.7 Distribución de <i>L. graveolens</i>	44
5.6.8 Recolección y Aprovechamiento de <i>L. graveolens</i>	45
5.6.9 Productividad de <i>L. graveolens</i>	45
5.6.10 Comercialización de <i>L. graveolens</i>	46
5.6.11 Métodos de extracción y análisis de aceites esenciales	47
5.6.12 Compuestos químicos de <i>L. graveolens</i>	47

5.7 Actividad biológica de los componentes de orégano	48
5.7.1 Capacidad Antioxidante	48
5.7.2 Capacidad antimicrobiana del orégano	51
5.7.3 Capacidad antimicrobiana del género Lippia	52
5.7.3.1 Capacidad antimicrobiana de timol y carvacrol	53
6. MÉTODOS	56
6.1 Material vegetal	56
6.1.1 Identificación del material vegetal	56
6.1.2 Preparación y manejo del material experimental	56
6.1.3 Preparación y aplicación de las soluciones	57
6.1.4 Distribución de tratamientos	58
6.1.5 Variables a evaluar	59
6.1.5.1 Biomasa	59
6.1.5.2 Aceites esenciales	59
6.1.5.3 Timol y carvacrol	59
6.1.5.4 Determinación de prolina	61
6.1.5.5 Análisis de clorofila	62
6.1.5.6 Fisiología fotosintética	63
6.1.5.7 Obtención de impresiones para el estudio estomático.	63
6.1.5.8 Análisis estadístico	64
7. RESULTADOS	65
7.1. Producción Biomasa	65

7.2 Producción de Aceite esencial	69
7.3 Producción Timol y carvacrol	73
7.4 Acumulación de Prolina	76
7.5 Síntesis de Clorofila	80
7.6 Densidad Estomática y Absorción de CO ₂	82
7.7 Análisis de Correlaciones entre variables evaluadas	86
8. DISCUSIÓN	91
9. CONCLUSIONES	96
10. LITERATURA CITADA	98
11. RESUMEN CURRICULAR	114

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I	Sensibilidad relativa de diferentes procesos de la planta frente al déficit hídrico	14
II	Producción de biomasa en diferentes ambientes inducidos con elementos estresantes en <i>Lippia graveolens</i> H.B.K.	65
III	Producción de peso en fresco y número de hojas por efecto de inducción de elementos en ambientes estresantes en <i>Lippia graveolens</i> H.B.K.	67
IV	Producción de aceite esencial en diferentes ambientes inducidos con elementos estresantes en <i>Lippia graveolens</i> H.B.K.	70
V	Producción de aceite esencial por efecto de inducción de estrés con elementos en ambientes en <i>Lippia graveolens</i> H.B.K.	71
VI	Producción de timol y carvacrol en diferentes ambientes con elementos inductores de estrés en <i>Lippia graveolens</i> H.B.K.	73
VII	Producción de timol y carvacrol por efecto de elementos inductores en ambientes de estrés en <i>Lippia graveolens</i> H.B.K.	74
VIII	Prolina acumulada por efecto de diferentes condiciones ambientales con elementos inductores de estrés en <i>Lippia graveolens</i> H.B.K.	77
IX	Prolina acumulada por efecto de diferentes elementos inductores de estrés en ambientes en <i>Lippia graveolens</i> H.B.K.	78
X	Clorofila total acumulada por efecto de diferentes condiciones ambientales con elementos inductores de estrés en <i>Lippia graveolens</i> H.B.K.	80
XI	Síntesis de clorofila promedio por efecto de elementos y ambientes estresantes en <i>Lippia graveolens</i> H.B.K.	82

XII	Numero de estomas y asimilación de CO ₂ por efecto inducción de estrés con ambientes de elementos estresantes en <i>Lippia graveolens</i> H.B.K.	83
XIII	Numero de estomas y asimilación de CO ₂ por efecto inducción de estrés de elementos en ambientes estresantes en <i>Lippia graveolens</i> H.B.K.	84

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Factores abióticos que causan estrés en las plantas y su interrelación	11
2	Estructura química de los componentes mayoritarios del aceite esencial de <i>Lippia graveolens</i> H.B.K.	48
3	Producción promedio de peso fresco y seco (A) y numero de hojas (B) en elementos inducidos en <i>Lippia graveolens</i> H.B.K.	68
4	Producción promedio de peso fresco y seco (A) y numero de hojas (B) en ambientes estresantes inducidos con <i>Lippia graveolens</i> H.B.K.	69
5	Porcentaje promedio de aceite esencial en elementos estresantes (A) y ambientes de inducción (B) en <i>Lippia graveolens</i> H.B.K.	72
6	Acumulación promedio de Timol y Carvacrol por efecto de inducción con elementos (A) y ambientes estresantes(B) en <i>Lippia graveolens</i> H.B.K.	75
7	Prolina acumulada en promedio por efecto de elementos (A) y ambientes estresantes (B) en <i>Lippia graveolens</i> H.B.K.	79
8	Síntesis de clorofila por efecto de elementos estresantes en diferentes intensidades de estrés en <i>Lippia graveolens</i> H.B.K.	81

9	Promedio de número de estomas y asimilación de CO ₂ por efecto de elementos estresantes (A) y ambientes de inducción (B) en <i>Lippia graveolens</i> H.B.K.	85
10	Relación entre ambientes inducidos y variables de peso fresco y seco (A) y número de hojas (B) en <i>Lippia graveolens</i> H.B.K.	86
11	Relación entre ambientes inducidos y variables de aceite esencial (A), número de estomas y asimilación de CO ₂ (B) en <i>Lippia graveolens</i> H.B.K.	87
12	Relación entre variables de aceite esencial con asimilación de CO ₂ (A) y número de estomas (B) en <i>Lippia graveolens</i> H.B.K.	88
13	Relación entre variables de timol y carvacrol con CO ₂ (A) y número de estomas y (B) en <i>Lippia graveolens</i> H.B.K.	89

NOMENCLATURA

Abreviatura	Significado
ABA	Acidoabscísico
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
APX	Ascorbatoperoxidasa
AR.	Ácido rosmarínico
BHA	Butilhidroxianiso
BHT	Butilhidroxitolueno
CAM	Metabolismo ácido de las crasuláceas
CE	Conductividad eléctrica
CMB	Concentración mínima bactericida
CMI	Concentración mínima inhibitoria
DPPH	1,1-difenil-2-picril-hidrazilo
dS m ⁻¹	Desimens por centímetro
FDA	Food and DrugAdministration
GPX	Glutación peroxidasa
GRAS	GenerallyRecognized As Safe
HOCl	Acido hipocloroso
p/v	peso/volumen
μmol m ⁻² s ⁻¹	Micromol por metro cuadrado por segundo
μl	Microlitros
UV	Ultravioleta

1. RESUMEN

En condiciones de invernadero fueron investigados los efectos de inducción de estrés sobre producción de biomasa, aceite esencial, timol, carvacrol y acumulación de prolina en *Lippia graveolens* H.B.K. En un diseño factorial en donde el factor “A” fueron tipos de estrés salino NaCl y iónico Cu^{2+} y Fe^{2+} , en cada uno de ellos se estudiaron 4 condiciones o ambientes como factor “B”: Solución nutritiva comercial (B0); Agua natural (B1); inducción de estrés con NaCl, Cu^{2+} y Fe^{2+} en moderada (B2) e intermedia (B3) intensidad. La producción de peso fresco, y número de hojas se redujo por inducción de estrés con NaCl en 30 g/planta y 40 % en número de hojas. La cantidad de aceite esencial fue mayor en 100 % en los ambientes bajo estrés con Cu^{2+} y Fe^{2+} . La cantidad de timol y carvacrol fue superior en promedio con los elementos Cu^{2+} Fe^{2+} con 63 y 25% respectivamente, pero las plantas en el ambiente de solución nutritiva y agua natural indujeron más timol y carvacrol. La prolina se acumuló indistintamente en las condiciones evaluadas pero en el promedio acumulado la cantidad de los elementos Fe^{2+} y Cu^{2+} fue mayor. La variable clorofila disminuyó en los ambientes estresantes en un 33%, el número de estomas también se redujo en un 26 % por efecto del estrés, en cambio la asimilación de CO_2 se potencializó por efecto de inducción de estrés con sales y iones en 34 %. El estrés inducido con salinidad y iones Cu^{2+} y Fe^{2+} , derivó en ajustes fisiológicos de la planta causando una mayor actividad enzimática antioxidante que conduce a mayor acumulación de metabolitos secundarios.

Palabras clave: Orégano, sales, metales, timol, carvacrol, prolina.

ABSTRACT

In greenhouse conditions were investigated the effects of stress induction on biomass production, essential oil, thymol, carvacrol and proline accumulation in *Lippia graveolens* H.B.K. In a factorial design where the factor "A" was saline types and ion NaCl stress Cu^{2+} and Fe^{2+} , in each 4 conditions or environments were studied as a factor "B": commercial nutritive solution (B0); Natural water (B1); stress induction with NaCl and Cu^{2+} Fe^{2+} in moderate (B2) and intermediate (B3) intensity. The production of fresh weight, and leaves number was reduced by stress induction with NaCl in 30 g/plant and 40% in leaves number. The amount of essential oil was increased by 100 % in the environments under stress with Cu^{2+} y Fe^{2+} . The amounts of Thymol and carvacrol were superior on elements average Cu^{2+} Fe^{2+} with 63 and 25 % respectively, but the environments nutritive solution and natural water induced more Thymol and carvacrol. Proline was accumulated on the evaluate conditions but the cumulative average was higher on Fe^{2+} elements and Cu^{2+} . Chlorophyll decreased in stressful environments by 33%, the number of stomata also was reduced by 26% stress effect, but CO_2 assimilation was increased because of the effect on stress with salts and 34% ion induction. These stress led to plant physiological adjustments producing more enzymatic antioxidant activity that produces more secondary metabolites accumulation.

keywords: Oregano, salts, metals, Thymol, carvacrol, proline

2. INTRODUCCION

Los esfuerzos de investigación agrícola se dirigen principalmente hacia el aumento de rendimientos, obtener cosechas con calidad adecuada, el aumento en la utilización de insumos eficiente y eficazmente y la adecuada combinación entre protección de cultivos e inocuidad. Menor interés ha recibido el mejorar la calidad nutricional de los productos, es decir, el contenido y balance de minerales, elementos traza, antioxidantes y compuestos fitoquímicos.

Por características edáficas y climáticas México es uno de los principales países productores de especies vegetales en el mundo, pocos saben de la riqueza que guardan los desiertos y semidesiertos mexicanos, su biodiversidad es de las mas ricas del mundo una de estas especies es el orégano mexicano *Lippia gravelolens*, crece en forma silvestre y su uso como condimento y hierba curativa incidió desde las antiguas culturas y continua explotándose de la misma manera hasta nuestros días (Alarcón,1993).

El orégano es una planta considerada como aromática y de uso medicinal, rica en aceite esencial con amplio potencial en el campo de la alimentación y farmacológico su aprovechamiento es una oportunidad para un interés mayor en el desarrollo de programas de investigación.

La composición química del aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens* HBK) es de gran importancia por su actividad biológica. Los aceites esenciales ricos en compuestos fenólicos son reportados en múltiples investigaciones por su alta efectividad antimicrobiana; El timol posee mayor efecto que el carvacrol contra las bacterias Gram negativas. Hay estudios preliminares que asociaron a los aceites esenciales del orégano con potencial anticancerígeno (Sivropoulou, 1996).

Cuando las plantas son sometidas a condiciones adversas, se genera un efecto que produce una respuesta en procesos fisiológicos y metabólicos (Benavides et al., 2001), ello indica la posibilidad de manipular la concentración o cantidad relativa de metabolitos a través de técnicas de manejo agronómico. La inducción controlada de estrés a través de compuestos señalizadores o prooxidantes es una conocida herramienta cada vez más utilizada para explorar las respuestas fisiológicas y metabólicas adaptativas de la planta (Kessmann et al., 1994). Por ello se considera factible su aplicación con el propósito de promover y/o incrementar biosíntesis de metabolitos secundarios (Gantet y Memelink, 2002).

La aplicación controlada de algún estrés ambiental origina estrés oxidativo celular, o bien la aplicación de un compuesto prooxidante como H_2O_2 , el ácido salicílico o los metales pesados causan cambios en el metabolismo redox de las plantas, cambios que dan lugar a través de una cascada de señales, la modificación de expresión genética y a la obtención de fenotipos con una diferente composición química. En particular en el caso de iones libres

de metales el factor inductor de la respuesta es la acumulación de radicales libres derivados de reacciones Fenton (Stosh y Bagchi.1995). Este mecanismo de toxicidad de los metales en forma iónica fue descrito para el cobre (Mengel y Kirkby, 2001) y para el hierro (Xing et al., 2010). En el caso de estrés inducido por la salinidad, produce el fenómeno oxidativo bien conocido en la primera fase de acción del estrés por sales, y se manifiesta a través de acumulación de osmolitos en hojas y el control de la apertura estomática (Chartzoulaki et al., 2009), aunado a la acumulación de prolina en hojas y raíces (Munn, 2008).

En el presente trabajo se evaluaron los efectos de soluciones salinas de NaCl y iónicas de cobre (Cu^{2+}) y hierro (Fe^{2+}), sobre la producción de biomasa, aceite esencial y metabolitos secundarios timol y carvacrol en *Lippia graveolens*.

3. HIPÓTESIS

La inducción de estrés salino con NaCl y iónico con cobre y fierro modifica la producción de biomasa, biosíntesis de aceites esenciales, carvacrol y timol y la fisiología de plantas de (*Lippia graveolens* H.B.K.).

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Cuantificar la producción de biomasa y timol y carvacrol en orégano mexicano en *Lippia graveolens* H.B.K. bajo condiciones de ambientes de estrés inducido por salinidad (NaCl) y iones metálicos (Cu^{2+} y Fe^{2+}) así como el estudio de las bases bioquímicas y fisiológicas de respuesta a dichas condiciones.

4.2 Objetivos particulares

1. Cuantificar la producción de biomasa y aceite esencial en orégano *L. graveolens* H.B.K. bajo estrés inducido con salinidad (NaCl) y iones Cobre (Cu^{2+}) y Fierro (Fe^{2+}).
2. Caracterizar y cuantificar las bases bioquímicas de respuesta (timol, carvacrol, prolina libre) en orégano *L. graveolens* H.B.K. bajo condiciones de estrés inducido con salinidad (NaCl) y iones Cobre (Cu^{2+}) y Fierro (Fe^{2+}).
3. Caracterizar y cuantificar las bases fisiológicas de respuesta en la producción de clorofila total, apertura estomatica y asimilación de CO_2 en *Lippia graveolens* H.B.K. bajo condiciones de estrés, inducido con salinidad (NaCl) y iones Cobre (Cu^{2+}) y Fierro (Fe^{2+}).

5. ANTECEDENTES

5.1 Estrés en plantas

5.1.1 Concepto de estrés

El estrés ambiental es una fuerte restricción para la productividad, se estima, que solo el 10% de la superficie arable se encuentra libre de estrés, el 20 % de la tierra presenta algún tipo de deficiencia o toxicidad mineral, el 26% es afectada por el estrés de sequía y el 15% por congelamiento, incluso, bajo condiciones de agricultura protegida como invernaderos se presentan estrés biótico y abiótico que disminuyen la cantidad y calidad de los productos (Blum, 2005).

Se ha definido al estrés como una desviación de las condiciones optimas para la vida. Como respuesta a dicha desviación se inducen cambios en todos los niveles funcionales del organismo pudiendo ser dichos cambios reversibles o permanentes, aun si la condición de estrés es temporal, es normal que la vitalidad de la planta se vea disminuida mientras se realizan los ajustes requeridos para la nueva situación. Si el estrés es intenso o si el periodo es demasiado largo entonces los daños latentes se transforman en daños irreversibles que pueden afectar a la planta entera o parte de la misma. El significado literal es restricción o fuerza que empuja deformando un cuerpo, en biología el termino estrés ha adquirido una connotación mas amplia, refiriéndose tanto a los estímulos ambientales que se apartan de los

rangos óptimos como al estado fisiológico que se observa en un organismo como consecuencia de los estímulos negativos (Larcher, 1995).

En biología el estrés sería un factor externo que actúa sobre un organismo. El estrés biológico no se mide como una fuerza o una tensión sino como una intensidad o una concentración, por ejemplo: intensidad luminosa, concentración de sustancias tóxicas. La tensión que se provoca sería el cambio interno provocado por el factor externo. Si es un cambio elástico existe una proporcionalidad lineal entre el factor externo y la intensidad del cambio. (Levitt J. 1980).

Con base en la experiencia somos capaces de distinguir rápidamente diversos estados de estrés considerando manifestaciones fenotípicas visuales como deformaciones, amarillamientos, manchados necrosis, etc otras manifestaciones son menos obvias y requieren de equipo especializado para detectarlas como asimilación de CO₂, la inducción de transcripción de ciertos genes, cambio en la composición química de ciertas estructuras etc. (Benavides et al., 2002).

Factores bióticos patógenos (agentes causales de enfermedad mediante infección de virus, viroides, bacterias, hongos), herbívoros como plagas (insectos, nematodos), interacciones simbióticas (leguminosa-rizobium), interacciones mutualistas (gramíneas-hongos endófitos). Plantas (parásitas, factores alelopáticos) que afectan procesos de captura de energía -asimilación de carbono, exportación de poder reductor y energía, respiración, componentes de rendimiento (Biemelt et al., 2000).

5.1.2 Factores ambientales que causan estrés

Son múltiples los factores que inducen estado de estrés en las plantas. El estrés ambiental es el principal factor. Estos cambios ambientales se originan principalmente por las actividades antropogénicas, que han causado la contaminación del aire y del suelo, la lluvia ácida, la degradación del suelo, la salinidad, el aumento de radiación UV-B, el cambio climático, etc. Además, las plantas están expuestas a los desastres naturales presiones climáticas o edáficas, por ejemplo, la alta irradiación, calor, frío, heladas tardías, sequía, inundaciones, y los desequilibrios de nutrientes. Algunos de estos factores de estrés pueden fluctuar significativamente en intensidad y duración en escalas de tiempo de horas, días, estaciones o años, mientras que otros pueden cambiar lentamente y poco a poco las condiciones de crecimiento de las plantas. Puesto que las plantas son organismos sésiles, necesitan medios flexibles para la aclimatación a las condiciones cambiantes del medio ambiente para mejorar la protección de una planta, es importante entender los mecanismos que contribuyen a la tolerancia al estrés (Schutzenduble and Polle, 2002)

5.1.3 Interrelaciones de Factores que inducen estrés en las plantas

Son principalmente factores no biológicos o abióticos aunque existen también factores biológicos que producen estrés, por ejemplo: factores mecánicos. (Figura 1)

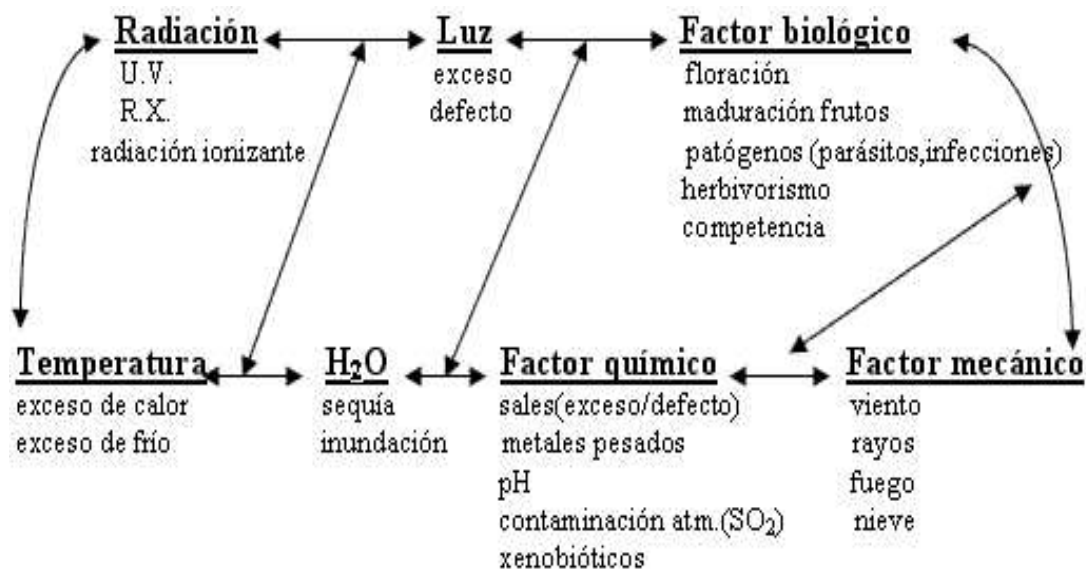


Figura 1. Factores abióticos que causan estrés en las plantas y su interrelación.

Así vemos que existen dos grandes bloques de factores estresantes: factores biológicos y no biológicos. Factores como la floración ó la maduración provocan un estrés en la planta aunque son procesos fisiológicos normales, pero provocan un debilitamiento y una vulnerabilidad ante determinados factores estresantes en esos momentos puntuales. Además estos otros modulan de forma indirecta otros factores. Todos pueden influir entre sí, afectando a la resistencia de la planta, así, por ejemplo una planta con estrés hídrico será más sensible a variaciones de temperatura, una planta estresada por contaminación atmosférica es más fácilmente infectada por parásitos. Las plantas no se encuentran sometidas a un solo factor que les provoque estrés sino a un conjunto diverso de factores que actúan sobre ella a la vez (El ergonomista, 2002).

5.2 Déficit hídrico como factor inductor de estrés

El estrés hídrico es el más común entre las plantas cultivadas y de comunidades naturales posiblemente solo se vea rebasado por el estrés por salinidad. El déficit hídrico y la sequia limitan la productividad vegetal mas que cualquier otro factor ambiental y generalmente la tasa de crecimiento de una comunidad vegetal o un cultivo son proporcionales a la disponibilidad de agua (Boyer, 1982). A causa de su esencial papel en el metabolismo vegetal, el agua es un agente que imparte estructura y orden a las moléculas biológicas así como a las interacciones entre ellas (importancia biofísica), además de utilizarse como fuente de los pares electrón – protón indispensables para el proceso fotosintético (importancia bioquímica), el bajo aporte de agua causa deshidratación que se asocia con degradación de las membranas celulares y con los organelos, degradación de las proteínas, disminución critica en la síntesis de las proteínas e incluso modificaciones en el DNA que origina mutaciones (Pugnaire et al., 1994; Hsaio et al., 1976). Dentro de los procesos biofísicos más afectados por la carencia de agua se encuentra la expansión celular y el crecimiento. A su vez estos procesos afectan otros procesos fisiológicos (Tabla 1).

Las plantas han desarrollado muchas estrategias para tolerar el déficit hídrico Pugnaire et al., 199) hace un resumen de los mismos como sigue:

1. Respuesta fisiológica o de modulación. Se caracteriza por una manifestación rápidamente reversible y con acción en el corto plazo (Cierre estomático).

2. Respuesta de aclimatación, que involucra cambios no rápidamente reversibles y con acción de corto plazo o incluso irreversibles y con acción de mediano plazo (Ajuste osmótico), derivados de la acumulación de solutos, cambios en la elasticidad de la pared celular y algunos cambios morfológicos.
3. Adaptación, esto es, estrategias a largo plazo que incluyen patrones fijos (genéticamente dependientes) de reparto de biomasa, modificaciones anatómicas que se heredan entre generaciones, mecanismos fisiológicos complejos como el metabolismo CAM, crecimiento reducido para optimizar el uso de agua y la captura de energía.

Frente al estrés hídrico la planta presenta dos mecanismos de respuesta: la evitación o escape y la tolerancia (Kramer, 1983) que incluye ciclos de crecimiento muy rápidos o madurez precoz, permitiendo aprovechar los rápidos periodos de disponibilidad de agua y evitando los periodos de sequía. Entre las plantas tolerantes se encuentran aquellas que evitan la deshidratación utilizando mecanismos morfofisiológicos como hojas pequeñas y cerosas, estructuras que facilitan la colecta de rocío, distribución radical muy superficial para la colecta de rocío, o bien raíces muy profundas (plantas freatíficas), modificación en la arquitectura del docel, cambios anatómicos en la epidermis como el tamaño y número de estomas, ubicación de los estomas en cavidades, cutículas gruesas y cerosas en combinación con tejidos suculentos metabolismo CAM, etc (Witowski and Lamot., 1997; Tilman, 1988), la mayoría de las plantas nativas de zonas desérticas caen en esta categoría de tolerantes evitadoras de la deshidratación.

Sensibilidad relativa de diferentes procesos de la planta frente al déficit hídrico

(Hsaio et al., 1976).

5.3 Acumulación de prolina bajo estrés

La acumulación de prolina libre bajo estrés han sido estudiadas por mas de 45 años en un gran número especies sujetas a condiciones de estrés hiperosmótico. La acumulación de prolina ocurre en concentraciones milimolares, dependiendo de la especie y de la extensión del estrés (Kavi Kishor et al., 2005). Se considera alta concentración de prolina celular (por encima del 80 % del contenido total de aminoácidos bajo estrés salino y 5% bajo condiciones normales). Síntesis y degradación ha sido documentada en muchas especies sujetas a estrés por sal y sequia. La prolina es un osmolito compatible altamente soluble, en altas concentraciones no tiene efectos perturbadores en la interacción con macromoléculas. Existen evidencias de que es un agente en el balance osmótico y protección de estructuras subcelulares (Yancey 2001; Ahmed et al., 1979) este osmolito resulta en la osmolaridad celular que puede regular el flujo del agua, esto mantiene la turgencia que es necesario para la expansión celular bajo estrés osmótico o deshidratación, mantiene la integridad las membranas, previene la desnaturalización de las proteínas y puede interactuar con enzimas para preservar la estructura de las proteínas que actúan como protección de estructuras y funcionalidad de M₄ lactato dehidrogenasa (Chadalavada, et a.l, 1994).

En la plantas la prolina es sintetizada no solamente por vía glutamato sino también por arginina/ornitina (Adams et a.l, 1980; Bryant et al., 1992). Arginina es convertida a ornitina por la enzima arginasa. En bacterias ornitina es degradada por α ceto δ aminovaleriato por la enzima ornitina α aminotrasferasa (α OAT), donde los ciclos

espontáneos pirroline 2- carboxilasa (P2C). P2C es finalmente catalizada a prolina por P2C reductasa, este paso no está bien establecido en el sistema de plantas sin embargo glutamato γ semialdehído (GSA) es derivado directo de ornitine por la enzima Ornitina δ aminotransferasa (δ -OAT).

Muchos organismos acumularán prolina muy por encima de las demandas necesarias para la síntesis de proteínas. El catabolismo de la prolina se presenta bajo estrés osmótico, (Peng and Vermal, 1996; Kiyosue et al., 1996), pero una vez que el estrés es reprimido, la prolina se oxida a P5C deshidrogenasa prolina (PDH; CE 1.5.99.8), también conocida como proli-naoxidas-a, la primera enzima de la ruta de degradación de prolina. P5C se regresa a glutamato por la enzima deshidrogenasa P5C (P5CDH; 1.5.1.12). Así, ambos PDH y P5CDH forman dos importantes enzimas en la degradación de prolina a glutamato en organismos superiores. La enzima PDH se une a la membrana interna de las mitocondrias. Esto es importante para las células cuando la oxidación de prolina genera el ciclo NADP/NADPH o balance redox (Hare and Cress, 1998). Entre los compuestos intermedios de biosíntesis prolina y catabolismo se encontró un compuesto semejante a glutamato y P5C los cuales podrían aumentar la expresión de varios genes osmóticamente reguladores en arroz como salt y dehydrin dhn4 (Iyer and Caplan, 1998). Las plantas de Oriza S tratadas con P5C y su análogo 3,4-dehidroprolina consumieron menos O₂, mostraron más nivel de NADH, pero se redujeron los niveles de NADPH y se acumularon varios osmolitos asociados con las plantas deshidratadas. Las conclusiones apoyan la propuesta (Hare and Cress, 1997) que señala que el metabolismo de la prolina puede controlar la expresión génica bajo tensión osmótica.

La prolina es la única molécula que se ha demostrado que protege las plantas contra el oxígeno singlete y radicales libres inducidos por el daño por estrés (Alia and Saradhi, 1997) y como un atrapador de los radicales OH, que es capaz de estabilizar las proteínas, ADN, así como las membranas. La actividad de atrapamiento Hidroxi-radical fue medidas para el sorbitol, manitol, myo-inositol y prolina y se encontró que la prolina es un efectivo atrapador radicales hidroxilos (Alia et al., 1997; Smirnoff et al., 1989).

Por lo tanto, la prolina no sólo es una importante molécula de señalización redox, sino también un extintor de eficacia de especies reactivas de oxígeno formada bajo condiciones de estrés por deshidratación por sal y metales en todas las plantas, incluyendo algas (Alia et al., 1997). Actividades de las enzimas catalasa, peroxidasa y polifenoloxidasa fueron promovidos por la prolina en vivo (Paleg et al., 1984). Sin embargo, la capacidad de la prolina para activar las enzimas puede sugerir un cambio conformacional limitado.

5.4 Estrés de las plantas por salinidad

Desde un punto de vista fisiológico la salinidad se expresa como concentración de sales en unidades milimolares (mM) y se utiliza como referencia en el efecto de una concentración particular sobre el proceso fisiológico. Como ejemplo una solución de 200 mM de NaCl inhibe totalmente la germinación de semillas de *Arabidopsis thaliana* (Zhu et al., 2002).

El problema principal de las plantas sometidas a altas concentraciones de sal es la retención osmótica del agua y, los efectos iónicos de toxicidad sobre las proteínas del citoplasma y las membranas, el agua es retenida osmóticamente de tal forma que conforme aumenta la concentración de sal en el agua se encuentra cada vez menos disponible para la planta. (Ashrf and Harris, 2004., Chinnusamy et al., 2005; Ehret and Plan., 1999; Hasegawa et al., 2000; Poustini and Siosemardeh, 2004; Yeo 1998; Zhu, 2003). La explicación en términos físicos es la siguiente: La energía libre del agua se conoce como potencial químico, el agua fluye espontáneamente desde un sitio de alta energía libre a uno de baja energía libre hasta que llega a un equilibrio termodinámico, esto quiere decir que en un suelo salino la planta debería invertir grandes cantidades de energía para extraer el agua del suelo es por ello, que rebasado cierto umbral de concentración de sal, la planta es entonces incapaz de extraer agua del suelo. La base de la respuesta celular conocida como ajuste osmótico es precisamente la concentración de solutos no tóxicos en la célula de tal manera de que el valor disminuya y sea competitivo contra el presentado por la solución salina (Ashrf and Harris, 2004).

El estrés salino es causante de estrés hídrico por lo que reduce el crecimiento y rendimiento del cultivo de diferentes maneras. Sin embargo, siendo la sal NaCl dominante en la naturaleza provoca dos efectos principales en las plantas es decir, toxicidad, potencial osmótico y iónico. En condiciones normales el potencial osmótico de las células vegetales es mayor que la solución del suelo. Las células vegetales utilizan este mayor potencial osmótico para absorber agua y minerales esenciales a través de células de la raíz de la solución del suelo. Bajo estrés salino el potencial osmótico en la solución del suelo supera el

potencial osmótico de las células de la planta debido a más alta concentración de sal, lo que reduce la capacidad de las plantas de absorber el agua y otros nutrientes esenciales (Munns et al., 2006). Por otro lado, los iones Na^+ y Cl^- puede entrar en las células y su prevalencia induce efectos tóxicos sobre las membranas celulares, así como en las actividades metabólicas en el citosol (Hasegawa et al., 2000). Estos efectos primarios del estrés por salinidad provocan efectos secundarios como la expansión reducida de las células, disfunción de la membrana, así como una disminución del metabolismo citosólico y la producción de intermediarios reactivos del oxígeno (ROS). Como resultado de ello, en casos extremos, las plantas pueden morir bajo estrés salino. En la soja, el estrés de salinidad inhibe la germinación y crecimiento de las plántulas, reduce la modulación, y disminuye la acumulación de biomasa y rendimiento, estos efectos son inducidos por la interferencia mediada osmóticamente con el agua y la absorción de nutrientes (Brady and Weill, 2002). Estrés por salinidad también puede causar clorosis severa y necrosis, y finalmente la muerte de la planta (Parker et al., 1987). Más agudos síntomas de estrés de salinidad son inducidos por la acumulación de cloruro en las hojas, que influye en la fotosíntesis estimula la formación de radicales superóxido, que causan daño a la membrana (Marschner, 1995). El cloruro es un anión importante en sales derivadas de fertilizantes y agua de mar (Parker et al., 1987). El estrés salino afecta también a fitohormonas que son sustancias naturales orgánicas, que influyen en los procesos fisiológicos en concentraciones bajas, ya sea en tejidos distantes a los que se transporten o en el tejido donde se produjo la síntesis (Davies, 1995).

Las dos hormonas para el cual existe una evidencia consistente de la regulación endógena en respuesta al estrés ambiental son ABA y etileno (Gianfagna et al., 1992), a pesar de que las giberelinas, auxinas y citoquininas también están implicadas en la respuesta al estrés (Levitt, 1980). El ácido jasmónico (JA) participa en diversos procesos de desarrollo, tales como la germinación de la semilla, crecimiento de la raíz, la fertilidad, la maduración del fruto y la senescencia (Creelman et al., 1992; Wasternack y Hause, 2002). JA activa los mecanismos de defensa de las plantas en respuesta a los insectos impulsados por las heridas, los patógenos y el estrés ambiental como la sequía, la baja temperatura y la salinidad (Wasternack and Parthier, 1997). El ácido salicílico (SA) ha dado lugar a la tolerancia de las plantas a muchos estreses bióticos y abióticos, incluyendo hongos, bacterias, virus (Delany et al., 1994), frío y sequía y el calor (Senaratna et al., 2003).

5.4.1 Efecto de sales en las plantas

Psarras et al., 2008, evaluaron el efecto de tres concentraciones de NaCl (0, 35 y 70 mM) sobre el crecimiento, las características de la calidad, fotosíntesis, producción de fruta en plantas de tomate. La salinidad redujo fotosíntesis dando por resultado reducidos valores de altura de planta, la producción de peso seco fue menor en un 25% y el 69% con 35 y 70 mM de NaCl, respectivamente con respecto a las plantas control. Los sólidos solubles totales y la acidez de la fruta aumentaron al subir la salinidad mientras que la fotosíntesis en la hoja disminuyó. Similares resultados reportan Belaqqiz et al., 2009 en *Thymus maroccanus* Ball que investigaron cinco diferentes niveles de salinidad (0, 50, 100, 150,

200 mM de NaCl). Los resultados expusieron que con el aumento de los niveles de sal ocurrió una disminución significativa de biomasa de brotes y raíces, sin embargo, el efecto adverso de la sal fue más pronunciado en la raíz que en los tallos. Este estudio mostró que el aceite esencial no presentó variación con el aumento de la sal. En general, esta especie mostró tolerancia moderadora a la sal.

Se llevó a cabo un experimento con *Mentha piperita* L., por Khorasaninejad et al., 2010, para estudiar el efecto de inducción del estrés con salinidad (NaCl) con niveles de 0, 50, 100 y 150 mM y solución Hoaglund sobre los parámetros de crecimiento, componentes del aceite esencial. Los resultados mostraron que el estrés de salinidad afectó significativamente la longitud del tallo y raíz, peso en fresco y seco de las raíces, longitud de los entrenudos y longitud estolones, los valores biomasa y aceite esencial así como mentol fueron mayores en condiciones de no salinidad.

La respuesta de las plantas de *Origanum vulgare* L., (Said- Al Ahl and Hussein, 2010), con regímenes diferentes de humedad en el sustrato, con irrigación con agua normal y salina adición de ácidos húmicos con potasio encontraron que la producción del aceite esencial y el peso fresco fue significativamente menor en el nivel de la humedad disponible del suelo (30%). El adicionar ácidos húmicos con potasio, tuvo un efecto positivo en biomasa y negativo en aceite esencial con la irrigación salina respectivamente. La composición del aceite esencial del orégano fue afectada indistintamente por regímenes de la humedad.

Said-Al et al., 2010, evaluaron los efectos de concentraciones de salinidad de suelos en niveles de 0, 1 500, 3 000 y 4 500 mg/kg-1 sobre el contenido de aceite y su composición en tres cultivares de *Ocimum basilicum* L. El contenido y composición de aceite esencial se incrementaron significativamente mediante el uso de 1 500 mgkg⁻¹ de salinidad en comparación con el control. Pero en contraste, hubo disminución significativa con el nivel mayor de suelo salino. Los tratamientos de suelos salino con 1 500 y 4 500 mg kg-1 aumentaron el contenido de linalol y, por el contrario, hubo una disminución en el contenido de eugenol con el uso de 1 500 y 4 500 mg kg⁻¹ de suelo salino. En contraste Said- Al Ahl y Mahomoud (2010) evaluaron en *Ocimum basilicum* L. el efecto de salinidad en combinación con Fe y Zn. La altura, así como el número de brotes y el peso de la planta, estos decrecieron en condiciones de suelo salino, pero, cuándo se incrementó la salinidad, la producción de aceite esencial aumentó. La aplicación de micronutrientes Fe y Zn, tuvo mayor efecto en la producción de biomasa y aceite esencial en condiciones de irrigación normal y salinidad, un compuesto semejante a glutamato y P5C, la concentración de monoterpenos linalol y metilcavicol disminuyeron por efecto de salinidad.

En genotipos de tejidos vegetales de *Glycine max* (L.) (Liu and Staden, 2001) se investigaron el efecto de inducción de estrés con NaCl y la acumulación de iones. Se encontraron susceptibilidades diferentes en las líneas evaluadas, produjeron menor peso fresco y seco en contracciones de 25 a 75mM además, los niveles de Na⁺ y Cl⁺ en callo se elevaron significativamente cuando los niveles de sal se elevaron, mientras, que K⁺, Ca⁺⁺ y Mg⁺⁺ se redujeron notablemente, la salinidad expreso estrés osmótico y acumulación mayor de Na⁺ causando deshidratación en los tejidos vegetales durante 12 días que estuvieron

expuestas, pero al cambiar a un medio sin sal, los callos se recuperaron del estrés y los niveles de los iones Na^+ y Cl^- decrecieron. Estos resultados sugieren que los efectos inhibitorios de la salinización sobre el crecimiento y acumulación de iones (Na^+ y Cl^-) pueden ser reversibles cuando la salinidad es suprimida. En este mismo sentido Niya L et al., (2008), evaluaron los efectos de adicionar NaCl en el suelo (100-400mM) sobre fotosíntesis, consumo y transporte de la sal, y contenidos intracelular del Na^+ y Cl^- en plantas de dos especies de *Kandelia* L. El estrés de las plantas se elevó con el aumento del NaCl, además, se encontró más del 90% del Na^+ 40% más del Cl^- . La tasa fotosintética neta (P_n) declinó con el aumento de salinidad, y la reducción más marcada ocurrió después de la exposición de las plantas a una salinidad severa (400mM NaCl). Sin embargo, los efectos inhibitorios del estrés severo del Na^+ contenido en la pared celular, citoplasma, vacuola y el cloroplasto variaron con la especie. En el estrés por sal causó una acumulación rápida y más alta del Na^+ y Cl^- en las hojas, sin embargo decrecieron cuando la salinidad disminuyó.

Los efectos adversos de NaCl inducida por estrés NaCl en plantas de soya sobre crecimiento y niveles endógenos de giberellinas (GA), ácido abscísico (ABA), ácido jasmónico (JA) y ácido salicílico (SA). Fueron: altura de planta, biomasa, contenido de clorofila, número de vainas, y rendimiento disminuyó significativamente en la respuesta de 70 mM y 140 mM de NaCl, el contenido endógeno de GA y SA libre se vio disminuido, mientras que se observó a un incremento significativo en el contenido endógeno de ABA y JA. Los resultados mostraron que el estrés salino reduce drásticamente el crecimiento y a su

vez causado por el efecto de decremento de niveles endógenas de hormonas (Hamayun, et al., 2010).

Khosravinejad et al., (2008) evaluaron la actividad de enzimas antioxidantes por efecto de estrés salino en niveles de 50 a 400 mM en cultivares de avena. Como resultado se encontró un incremento lineal entre la actividad CAT, APX, SOD y GPX y la concentración de sal. En general la actividad antioxidante se incrementó en las raíces y tallos pero el incremento fue más significativo en raíces, la enzima CAT fue la de mayor incremento. La actividad enzimática también fue investigada además de niveles de prolina y clorofila en (*Olea europaea* L CV Chemlali) por efecto de irrigación con agua normal ($CE = 1.2 \text{ dS m}^{-1}$) y agua salina ($CE = 7,5 \text{ dS m}^{-1}$). La actividad fotosintética y contenido de clorofila de hojas disminuyeron en agua de riego salina. La fotosíntesis neta de hojas jóvenes fue 24.5 y $14.9 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ en agua normal y agua salina respectivamente. La relativa reducción de clorofila fue mayor al 50% en agua salina comparado con plantas tratadas con agua normal. El contenido prolina, la actividad de enzimas de SOD, CAT y APX aumentó bajo la irrigación con agua salina. El aumento en contenido de prolina fue más importante en hojas que en raíces. En hojas jóvenes, el incremento de actividad antioxidante en plantas bajo salinidad fue 2.67, 3.61, y 1.85 veces, mayor, para el SOD, APX y CAT respectivamente comparado con agua normal. Estos resultados, la interacción entre el sistema de antioxidante y el contenido de prolina parecen estar implicada en los mecanismos de tolerancia de sal en el árbol oliváceo (Amhed et al., 2009).

En planta de *Cassia angustifolia* se investigó el efecto de NaCl (80 y 160 mM) y CaCl_2 (5 mM y 10 mM) y combinación de NaCl y CaCl_2 (80 mM 10 mM y 160 mM y 10 mM) en diferentes etapas de desarrollo: pre-floración (A1), floración (A2) y post-floración (A3), en comparación con los controles, biomasa en raíz, tallo y hoja disminuyó significativamente con cada tratamiento de NaCl, mientras que en tratamientos de CaCl_2 se observó lo contrario. La aplicación de la combinación de NaCl y CaCl_2 redujo la biomasa, pero esta reducción fue inferior a lo observado en NaCl individualmente, sin embargo, la acumulación de prolina en las hojas fue 10 veces superior a los controles con tratamiento de 160 mM NaCl y 10 mM CaCl_2 y 5 veces superior en plantas tratadas con NaCl (160 mM) solo. (Anjun et al., 2005).

El contenido de prolina y el contenido relativo de agua (CRA), fueron estudiados en plantas de tres cultivares de *Capsicum annuum* L. “páprika” cv. Papri king, Papri Queen y Sonora sometidas a diferentes concentraciones de NaCl (0, 5, 10, 25, 50 100 y 200 Mm) durante 8 días. El CRA, disminuyó al aumentar la concentración de NaCl. La sal indujo aumento en el contenido de prolina en hojas de los tres cultivares analizados, mostrando diferencias significativas entre los tratamientos. (Chaman, 2007).

Como respuesta al tratamiento exógeno de prolina con precursores de prolina (ornitina y arginina) y la prolina analógica (azetidine-2-carboxilato, A2C), en la línea clonal orégano O-1 se evaluó la estimulación de biosíntesis de ácido rosmarínico (RA). Los resultados mostraron incrementos significativos en el contenido de RA y simultáneamente mayores

niveles de prolina endógena fueron observados en comparación con el control. Tratamiento análogo (A2C) solo, estimuló niveles más altos de RA sin aumento en prolina endógena. Niveles de prolina endógena después de 30 días fueron superiores en todos los tratamientos de prolina y ornitina con o sin A2C, pero no en los tratamientos precursores con A2C o arginina solos. La estimulación de la síntesis de la RA en respuesta a prolina o prolina-precursores con o sin A2C sugirió que la desregulación de prolina -oxidación y síntesis de prolina pueden ser importantes para la biosíntesis de RA de orégano. Esta estimulación de biosíntesis de RA proporcionó sólidos indicios que la síntesis de prolina pueden vincularse a la estimulación de vía pentasafosfato y puede ser la llave hacia la vía del ácido shikímico y fenilpropanoide como precursor de metabolitos. RA también estimuló compuesto como carotenos totales y endurecimiento de tejidos del tallo, indicando posible lignificación debido a la polimerización de metabolitos fenólicos (Yang and Shetty, 1998).

5.5 Estrés por metales

Los micronutrientes son esenciales para la vida, y entre ellos, son esenciales los metales pesados, como el zinc y el cobre. Zinc, por ejemplo, sirve como cofactor en muchas enzimas y como un elemento estructural en factores de transcripción (Guerinot and Eide, 1999). Sin embargo, por encima de una cierta concentración crítica son tóxicos, para ello, la planta implementan mecanismos para mantener las concentraciones internas en niveles

de disponibilidad fisiológica dentro de los límites. Otra amenaza a los organismos del suelo es la biodisponibilidad de metales no esenciales tales como el cadmio y el plomo, que pueden ser tóxico en bajas concentraciones. Los metales no esenciales son lentamente eliminados y en su lugar se acumulan en los organismos del suelo como las lombrices de tierra. Por lo tanto, la contaminación de metales pesados presenta un grave peligro para la salud en muchos de los organismos, que exige medidas preventivas específicas (Nawrot et al., 2006).

Cuando se acumula el metal en exceso causa alteraciones en varios procesos como transcripción genética (Richardson et al., 1993), fotosíntesis y transporte de electrones fotosintéticos (Krupa, 1993; Yruela et al., 2006), biosíntesis de clorofila (Mocquot et al., 1996) e integridad de la pared celular (De Vos et al., 1992). El incremento de los derivados tóxicos del oxígeno es causado por situaciones de estrés por metales (Kampfenkel et al., 1995; Weckx and Clijsters, 1996). Las especies reactivas al oxígeno causan serios disturbios en el metabolismo de los componentes celulares debido el estrés oxidativo (Halliwell, 1992) el mayor efecto dañino en estas especies son los productos celulares como peroxidación de los lípidos en las membranas (Tappel, 1980; Halliwell. 1982) un exceso en la actividad redox de metales como cobre y hierro tiende a formar reacciones univalentes de óxidoreducción lo que induce estrés oxidativo (Luna et al., 1995; Kampfenkel et al., 1995).

Para contrarrestar la disfunción metabólica causada por estrés abiótico, las plantas utilizan diferentes estrategias. Una de ellas es a través de varias reacciones bioquímicas, las

células de la plantas para cuando el ion metal entra en el citosol es inmediatamente inactivado, este proceso es mediado por la fitoquelación (Zenk, 1996). Para su protección las células están equipadas por enzimas desintoxicadoras de radicales oxígeno semejantes a superoxidodismutasa (SOD), ascorbato peroxidasa (APX) (Asada, 1987; Foyer and Harbinson, 1994).

5.5.1 El hierro

Es el cuarto elemento más abundante en la corteza terrestre. Las plantas son la principal fuente de Hierro, en la mayoría de las dietas, por lo que constituye un aspecto medular en la nutrición de la humanidad. El hierro se presenta en dos estados El Fe^{+3} o férrico es oxidado a Fe^{+2} o ferroso en presencia de O_2 , el Fe se precipita rápidamente por lo tanto la forma termodinámica más estable es también la más difícil de acceso para los organismos. El contenido normal en base seca de Fe en el tejido vegetativo de hortalizas es de 50-300 ppm (Olsen et al., 1981) el contenido de Fe (III) de muchos suelos es mucho mayor que esta cantidad pero como se ha mencionado esta forma iónica presenta poca solubilidad (Manchester 1995).

Las plantas tienen dos vías o estrategias por medio de las cuales se puede aumentar la disponibilidad Fe (III) en la solución de agua del suelo: Las monocotiledóneas no gramíneas y las dicotiledóneas pueden disminuir el pH en la rizosfera lo cual solubiliza el Fe (III) y promueve la reducción a Fe (II). Las gramíneas excretan fitosideróforos, aminoácidos no

proteicos que solubilizan los iones Fe^{+3} formando un complejo de Fe (III) - fitosideroforo (Olsen et al., 2002).

Los iones metales como Fe, Cu y Zn no atraviesan libremente la membrana celular, las formas de paso son quelatos (moléculas atraparoras de iones metálicos). Los quelatos son llamados ionóforos y los ionóforos específicos para el hierro son conocidos como sideroforos. Desde un punto de vista fisiológico el hierro se encuentra en los citocromos que son partes funcionales de los sistemas respiratorio y fotosintético su propiedad más importante en la mayoría de las plantas se ve implicada en las reacciones redox de cloroplastos, mitocondrias y peroxisomas. (Benavides et al., 2002).

Para realizar la reducción de Fe III a Fe II se requiere la transferencia de electrones desde el citosol a través de la membrana plasmática, las células vegetales de la plantas como estrategia I poseen dos sistemas de transferencias: el sistema estándar presente en todas las células y un sistema turbo de alta eficiencia, el sistema turbo es el reductor de los complejos Fe III- quelatos que es inducido en las células de transferencia en ausencia de Fe al parecer el potencial reductor del sistema turbo proviene NADPH producido por la NADP^+ - isocitrato deshidrogenasa citosólica en este sistema se encuentra la enzima Fe – quelato reductasa (FCR) que es utilizada por la mayoría de las plantas para (excepto gramíneas que carecen de sistema turbo) para adquirir Fe soluble según Moog et al., 1995 la enzima FCR es inducida por la deficiencia de hierro una vez reducido el Fe III a Fe II. La absorción del mismo por las plantas como estrategia I puede ser en forma quelatada o en forma iónica libre Fe^{+2} siendo esta última forma más común. En las plantas que utilizan la estrategia II

no es el Fe^{+2} sino los complejos Fe (III) en la rizosfera (los fitosideroforos pueden actuar como acarreadores de otros cationes (Zn, Mn y Cu) pero el mencionado sistema de transporte de alta afinidad es inducido por hierro. Una vez que es absorbido por las raíces el Fe^{+2} puede ser oxidado formando Fe (III)-citrato o bien es incorporado en ferritinas (proteínas de almacenamiento de hierro de la raíz), que ocurra una cosa u otra depende de los niveles y potencial de reducción del ascorbato y fenólicos reductores como el ácido cafeico el ácido clorogénico el ácido dihidro cafeico y el ácido 3,4 dihidroxicinbenzoico. En otras palabras las ferritinas constituyen un almacén dinámico cuya magnitud parece depender en parte del nivel redox de los tejidos (Hughes, et al., 1992).

5.5.2 El Cobre

Es un metal esencial para el crecimiento y desarrollo normal de las plantas, pero también potencialmente tóxico, participa en numerosos procesos fisiológicos y es un cofactor para muchas metaloproteínas, sin embargo cuando cantidades excesivas están presentes en las células inhiben el crecimiento vegetativo y afectan importantes procesos celulares (Transporte de electrones fotosintéticos Yruea, 2005). Bajo condiciones fisiológicas cobre existe como Cu^{2+} y Cu^{+} , actúa como un elemento regulador de la estructura de proteínas y participa en el proceso de fotosíntesis y respiración mitocondrial. Como respuesta al estrés oxidativo, metabolismo de paredes celulares y hormonas señalizadoras los iones Cu actúan como cofactores en muchas enzimas semejantes a Cu/Zn

superoxidodismutasa (SOD), citocromo-c oxidasa, aminooxidasa, lactasa, plastocianina y polifenoloxidasa (Manchester, 1995; Raven et al., 1999).

Las propiedades redox que marcan al Cu como un elemento esencial, también Cu^{2+} y Cu^+ contribuyen a catalizar la alta toxicidad causada por radicales hidroxilo, con subsecuentes daños en DNA, lípidos proteínas y otras biomoléculas (Halliwell, 1982). Las altas concentraciones de Cu puede causar extrema toxicidad como clorosis y necrosis, retraso en el crecimiento e inhibición de crecimiento de raíces (Van Assche and Clijsters, 1990; Marschner, 1995). Las concentraciones de exceso de Cu inhiben el crecimiento además de interferir con importantes procesos celulares como fotosíntesis y respiración (Marschner, 1995; Prasad y Strzalka, 1999). Las plantas crecen normalmente en la presencia de altos niveles de Cu pero exhiben reducción de biomasa y síntomas de clorosis. Un bajo contenido de clorofila y alteración de estructura de cloroplastos y composición de tilacoides de las membranas fue señalado por Baszynski et al., 1997; Pätsikka et al., 1998, Lidon and Henriques, 1991, 1993; Ciscato et al., 1997; Quartacci et al., 2000). En resumen el Cu interviene en la biosíntesis de la maquinaria fotosintética modificando los pigmentos y la composición de la proteína de productos fotosintéticos de las membranas.

Yruelas et al., 1995 y Pätsikka et al., (1998) investigaron la interacción de toxicidad de Cu con fotoinhibición y procesos de recuperación de fotosistema II demostrando que Cu mejora el efecto adverso de la luz. La actividad fotosintética decrece cuando los organismos oxigenicos son expuestos a prolongada intensidad de iluminación. Este proceso incluye la incapacidad funcional de transporte de electrones PSII y el daño estructural de la reacción

central, que es conocido como fotoinhibición (Aro et al., 1993). Considerando que Cu es un eficiente catalizador en la formación de especies reactivas a oxígeno (ROS), esto sugiere que cuando se incrementa la toxicidad por Cu con luz por fotoinhibición es debido a la producción de radicales hidroxilo (Yruelas et al., 1996), con diferente propósito Ptsikka et al., (2002) explica efectos severos causados por altas concentraciones de Cu durante la fotoinhibición in vivo, observaron que la reducción en clorofila en hojas expuestas a altas concentración de Cu hicieron más susceptible la fotoinhibición como una consecuencia de que Cu induce deficiencia de Fe.

Las concentraciones en exceso de Cu inhiben el crecimiento además de interferir con importantes procesos celulares como fotosíntesis y respiración (Marschner, 1995; Prasad y Strzalka, 1999). Las plantas crecen normalmente en la presencia de altos niveles de Cu pero exhiben reducción de biomasa y síntomas de clorosis, bajo contenido de clorofila y alteración de estructura de cloroplastos y composición de tilacoides en las membranas fue señalado por (Baszynski et al., 1997; Päsikka et al., 1998; Lidon and Henriques, 1991; Ciscato et al., 1997; Quartacci et al., 2000). En resumen el Cu interviene en la biosíntesis de la maquinaria fotosintética modificando los pigmentos y la composición de la proteína de productos fotosintéticos de las membranas.

5.5 Efecto de exceso de metales en plantas

En una evaluación del exceso de Fe (III)-EDTA con 100 μ M, inducido en raíces de *Nicotina glauca*, los resultados mostraron síntomas visibles de toxicidad como

manchas oscuras, la tasa de fotosíntesis se redujo en un 40%, el aumento de reducción del fotosistema II, y una mayor activación del tilacoide, el exceso de Fe duplicó la actividad de catalasa. Para hacer frente a daño celular, la respiración citosólica aumentó en frecuencia y la actividad de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa se incrementó más del doble, como indicativo de estrés oxidativo. (Kampfenkel et al., 1995).

Nitrosomona europaea es una bacteria amimooxidativa, tiene un alto requerimiento de Fe y tiene 90 genes dedicados a la adquisición de este elemento. Bajo condiciones de Fe limitado (0,2 μ M Fe), *N. europaea* fue capaz de asimilar hasta el 70% del hierro disponible en el medio a pesar de que es incapaz de producir sideróforos. Además de sideróforos exógenos el tratamiento Fe-limitado aumentó el crecimiento (masa celular final). Las células Fe-limitado, tenían menores hemo y contenido celular de Fe, la reducción de las capas de la membrana, y bajo NH_3 NH_2OH , dependieron del consumo de O_2 . La asimilación de Fe-reaccionada con proteínas, semajante a TonB dependieron de sideróforos- receptores, para enterobactina y la difusión de proteínas Omp C, expresaron niveles más altos en condiciones de Fe- limitado, aportando pruebas bioquímicas de la adaptación de *N. europaea* en condiciones Fe-limitadas (Wei et al., 2006)

El efecto de exceso de cobre (Cu) fue evaluado en soluciones hidropónicas en plantas de tomate con diferentes concentraciones de Cu. 0,05, 0,15, 0,20 y 0,35 mM, se observó que la materia seca, longitud de la raíz y el área foliar disminuyó con el tiempo de exposición a la concentración de Cu. La absorción de nutrientes se vio afectada en la

medida las concentraciones de Cu se incremento. El calcio (Ca), hierro (Fe) y zinc (Zn) disminuyó en las hojas. En las raíces ocurrió lo mismo con estos elementos a excepción de Ca, lo que indica que la absorción de estos se vió afectada en la raíz y consecuentemente el desplazamiento a la parte aérea. La deficiencia de hierro en la hoja causó clorosis y disminución de los niveles de clorofila. Las actividades de las tres enzimas estudiadas en las hojas guayacol peroxidasa (POD), catalasa (CAT), y polifenol oxidasa (PPO) disminuyó cuando el estrés bajó (Martins and Mourato, 2006).

El efecto de cobre en el la síntesis de clorofila (a + b), prolina, proteínas y ácido abscísico fueron investigados en plántulas de girasol (*Helianthus annuus* L.) bajo los siguientes tratamiento de CuCl_2 (0, 4, 0,5 y 0,6 mM). El cobre en exeso causó aumento significativo en ácido abscísico en las raíces, brotes y hojas de las plántulas, aumento la prolina y clorofila total no se redujo por efecto del exeso de cobre. EL nivel de ácido abscísico se incremento conforme al nivel de concentración de Cu aplicado. Los niveles de cobre por encima de los requerimientos de las plántulas no producen efectos negativos en plántulas de girasol (*Helianthus annuus* L.) (Fiktiye and Sevdra, 2007).

Se estudió la secuencia de varias reacciones metabólicas, relacionadas con el daño oxidativo y protección, en hojas primarias de *Phaseolus vulgaris* en función de una concentración tóxica de Cu (630 μM). Un aumento transitorio de peroxidación en la membrana se observó en las hojas primarias durante el período de captación de Cu, este aumento fue debido principalmente a las propiedades oxidantes propias del cobre y no a una estimulación de la actividad de la lipoxigenasa. En el experimento, la peroxidación de las

membranas y K^+ en la raíz no estaban directamente relacionadas durante tres días posteriores a la aplicación de Cu, cuando se detectaron productos en la hoja de peroxidación lipídica, se mejoró la permeabilidad de la membrana citoplasmática para K^+ . Sin embargo, Cu estimuló la actividad de catalasa y peroxidasa ascorbato. Estas enzimas protegieron los tejidos contra el daño del estrés oxidativo, el contenido de peróxido de hidrógeno se redujo significativamente. La Superóxido dismutasa no estuvo involucrada en este mecanismo de defensa (Weckx et al., 1996).

En una investigación realizada por Shing et al., 2010, se sugiere la participación de prolina en la tolerancia a estrés inducido por cobre en genotipos de *Cicer arietinum* (garbanzo). La base de la tolerancia al exceso de cobre se caracterizó mediante el análisis de incremento de enzimas antioxidantes (superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa y catalasa) y acumulación de prolina. Todos los genotipos mostraron actividad de superóxido dismutasa. La actividad de enzimas; ascorbato peroxidasa no aumentó en los tratamientos con 25 y 50 μM de cobre. La actividad de catalasa, aumentó en concentraciones inferiores de cobre pero no a 50 μM . Tal divergencia en las respuestas de estas enzimas minimiza su importancia en la protección contra el estrés. Basado en los resultados, se concluyó que prolina mejora la tolerancia al exceso de cobre y mejora de la peroxidación en garbanzo.

En el alga *Scenedesmus* sp se indujeron 4 niveles Cu y/o Zn y prolina. El nivel de prolina intracelular aumentó notablemente hasta 10 μM con Cu, pero concentraciones más altas fueron inhibitorias. Sin embargo, la prolina intracelular aumentó con concentración creciente de Zn, Cu y Zn, indujo estrés oxidativo manifestándose un incremento de lípido -

peroxidación y permeabilidad de la membranas y reducción de radicales libres. El pretratamiento con 1 mM de prolina durante 30 minutos atenuó por completo la lípido peroxidación, el flujo de K^+ y radicales libres. El pretratamiento con prolina sólo indujo ligeramente estrés oxidativo con Zn. dentro de las células el pretratamiento con prolina aumentó el nivel de Cu (25-54 %) y el Zn (19-49 %). Esto no afectó las actividades de superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa o catalasa. El presente estudio demostró que prolina posiblemente actúa como desintoxicante en especies reactivas de oxígeno (Tripathi and Gaur, 2004).

En *Spirodela Dendrophylax* Schleid se evaluarón respuestas fisiológicas utilizando exceso de hierro (Fe^{+3}) y cobre (Cu^{+2}) hasta con niveles de 100 mg/L. Los resultados demostraron que el exceso de estos elementos causó necrosis así como abscisión en raíces en concentraciones excesivas de metales. La síntesis de clorofila y proteínas como carbohidratos y la absorción de nitrógeno y fosfato fueron inhibidas seriamente por el cobre y el exceso de hierro. El Contenido de prolina disminuyó con altas concentración de hierro o cobre, sin embargo, el contenido de malondialdehído (MDA) (antioxidante) aumentó con niveles de concentración mayor de hierro o cobre. (Xing and Liu, 2010).

La influencia de Cd y Hg en la síntesis de clorofila " α ", clorofila " β ", clorofila total y prolina en *Cicer arietinum* L. se evaluó con y sin adición de nitrógeno. Tratamientos de cadmio y mercurio en 10 y 25 $\mu\text{mol/L}$ afectaron el contenido de clorofila y prolina, en comparación con el control. Sin embargo, la adición de nitrógeno (5 $\text{m}\mu\text{M/L}$) de alguna manera minimiza el efecto de metales pesados. Cadmio y mercurio en 10 $\mu\text{mol/L}$ produjo

un incremento sobre las clorofilas. Mientras que las concentraciones más altas (25 $\mu\text{mol/L}$) redujeron el contenido de clorofila. El contenido de prolina se incrementó en tratamientos de Cd y Hg (10 y 25 $\mu\text{mol/L}$). En este caso el nitrógeno adicional redujo el contenido de prolina en plantas tratadas con Cd y Hg. (Shfi and Agnihortri, 2010).

Los efectos del estrés por metales pesados en la actividad de enzimas antioxidantes y la peroxidación lipídica se estudió en las hojas y las raíces de dos especies de mangle, *Kandelia candel* y *Bruguiera gymnorrhiza*, cultivadas bajo una solución con 10 % de NaCl más cinco niveles de metales pesados (Pb^{2+} , Cd^{2+} y Hg^{2+}). En las hojas bajo tratamiento con metales pesados destacó el aumento de la actividad de superóxido dismutasa (SOD) y peroxidasa (POD) fluctuado en los niveles de estrés en comparación con el control, mientras que la actividad de catalasa (CAT) se incrementó con los niveles de estrés en *K. candel*, pero se mantuvo sin cambios en las hojas de la *B. gymnorrhiza*. El aumento de la actividad de las enzimas demostró que *K. candel* es más tolerante a los metales pesados que *B. gymnorrhiza*. La peroxidación lipídica se incrementó sólo en las hojas de las plantas bajo estrés con metales en comparación con el control. Estos resultados indican que la actividad antioxidante puede jugar un papel importante en *K. candel* y *gymnorrhiza* B. (Zhang et al., 2007) bajo estrés con metales pesados.

El zinc es un micronutriente que tiene un papel esencial en los procesos fisiológicos y metabólicos en plantas como un cofactor estructural en 300 proteínas catalíticas y no catalíticas, pero este es muy tóxico cuando esta disponible en cantidades elevadas. Las plantas regulan sus concentraciones internas de zinc en un proceso llamado homeostasis. La

especie *Thlaspi caerulescens* es considerada excepcional como hiperacumuladora de zinc, además a altas cantidades de níquel y cadmio, sin mostrar signos de toxicidad. Esto debería tener efectos sobre mecanismo de homeostasis del zinc. Se examinó en detalle los perfiles de transcripción de las raíces de las plantas de *Arabidopsis thaliana* y *T. caerulescens* desarrolladas en medios con deficiencia, suficiencia y en exceso de zinc. Cuando se compara con *A. thaliana* y *T. caerulescens* en cada exposición de zinc, más de 2200 genes se expresaron diferencialmente. Mientras que una gran parte de estos genes son de función desconocida aún, muchos genes con una expresión diferente entre *A. thaliana* y *T. caerulescens* parecen funcionar en la homeostasis del metal, en respuesta al estrés abiótico. (Van de Mortel et al., 2006).

5.6 Generalidades del Orégano

El orégano es una planta fuertemente aromática y de sabor intenso, su aroma es debido a que es rico en contenido de aceite esencial. Con el nombre "orégano" se conoce a más de dos docenas de diferentes especies de plantas, presentan flores y hojas con olor característico a "especioso". Las hojas secas del *Origanum vulgare*, nativo de Europa y de *Lippia graveolens*, planta nativa de México son de uso culinario común (Pierce, 1999) Su uso práctico en cocina es por excelencia como saborizante en los platillos. También se consume ampliamente, por sus propiedades tónicas, digestivas, estomacales y antiasmáticas.

Entre la lista de especies conocidas como “orégano” cuatro son comúnmente utilizadas para propósitos distintos estas son: (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* Link Ietswaart); orégano español (*Coridohymus capitatus* (L.) Hoffmanns Link); orégano turco (*Origanum onites* L.) y orégano Mexicano (*Lippia graveolens* H.B.K.), Ietswaart, (1980).

El género *Origanum* subespecie *hirtum* (Link) pertenece a la familia Lamiaceae conocida como orégano griego es la más estudiada, especialmente en relación a la composición y calidad de su aceite esencial, tiene un importante valor comercial. En esta subespecie el rendimiento del aceite esencial en la hoja seca varía entre 2 - 6%. (Arcial et al., 2005). Esta especie está cubierta de pelos glandulares; su tallo es rojizo, anguloso y ramificado. Sus hojas son opuestas, de ovales a elípticas, su ápice es agudo y en las márgenes presenta glándulas ciliadas llenas de aceites esenciales. Sus flores son pedunculadas, labiadas, de color rosa púrpura y blanco (Fonnegra y Jiménez, 2007). Su aceite esencial es amarillo claro que se oxida rápidamente, sobre todo en contacto con el hierro y adquiere una coloración rojiza (Castillo and Martínez, 2007).

Los compuestos mayoritarios encontrados en *O. vulgare* ssp. *Hirtum* son los monoterpenos fenólicos oxigenados carvacrol 59-61.3% y timol 6.5-13.9 (Bozin et al., 2006; Lee et al., 2007). Por cromatografía de gases/espectrometría de masas se han identificado 56 compuestos diferentes (Ruso et al., 1998., Milos et al., 2000, Aligiannis et al., 2001). Estos componentes también se han encontrado en *O. dictamnus* (Sivropoulou et al., 1996) y se sabe que otras especies como *O. scabrum* y *O. microphyllum* contienen alrededor de 28 y 41 compuestos diferentes, respectivamente (Aligiannis et al., 2001).

En el aceite del orégano que crece en forma silvestre se ha encontrado la presencia dominante de carvacrol y timol. Se ha observado que un incremento en los porcentajes de timol provoca un decremento en el contenido de carvacrol (Ruso et al., 1998).

De manera popular se utiliza para dolores musculares, afecciones respiratorias y trastornos digestivos (Pamplona, 2006). Su acción expectorante se debe a que actúa directamente sobre el epitelio bronquial ejerciendo un efecto irritante y aumentando las secreciones bronquiales. El efecto digestivo y antiespasmódico se justifica por el aumento en la producción de jugos gastrointestinales y por el efecto relajante de la musculatura lisa. No obstante, está contraindicado durante el embarazo y la lactancia. Además, en dosis extraterapéuticas puede tener efectos estupefacientes (Vanaclocha and Cañigual, 2006). El aceite esencial de esta especie tiene un buen efecto antioxidante en margarina (Tafur et al., 2005) y en yema de huevo (Bernal et al., 2003). También los extractos obtenidos con etanol y cloroformo evitan la oxidación y el deterioro del color en piezas de carne de cerdo (Hernández-Hernández et al., 2009).

5.6.1 El género *Lippia graveolens* H.B.K.

En México se conocen 40 especies de orégano que pertenecen a cuatro familias botánicas: (Lamiaceae, Verbenaceae, Asteraceae y Fabaceae. Verbenaceae), comprende a los taxa de mayor importancia de acuerdo a su distribución y a sus características aromáticas. A ella pertenece el género *Lippia*, con las especies; *L. palmeri*, y *L. graveolens* Kunth

Sinonimio: *L.berlandieri* Schauer (Saénz y Villavicencio 1993; Villavicencio et al., 2007). Esta planta posee un fuerte aroma y un sabor más nítido y pungente que el de otros géneros. Tales características son atribuidas a su alto contenido en aceite esencial. Sus usos, tanto culinarios como terapéuticos son los mismos que los de las especies europeas. (Huerta, 2007).

5.6.2 Nombres comunes de *L. graveolens*

Hierba dulce, epazote, epazotl, orégano de castilla, orégano cimarrón, orégano silvestre, oreganillo loco, romerillo de monte, sacmumutz (Villavicencio, 2007).

5.6.3 Descripción botánica de *L. graveolens*

El género *Lippia* son arbustos de 0.70 a 2.0 m de altura; presentan hojas opuestas o alternadas, dentadas, aserradas o lobadas; inflorescencias en forma de cabezuelas o espigas breves, contraídas, axilares, solitarias o numerosas, constituidas por muchas flores; flores pequeñas, sésiles, naciendo en las axilas de brácteas conspicuas, imbricadas, algunas veces decusadas o seriadas; cáliz pequeño, membranoso, generalmente comprimido o campanulado, carinado; corola zigomorfa, tubo cilíndrico, recto o curvo, limbo oblicuo, amplio, un poco bilabiado, lóbulos de 4; estambres 4 y didínamos, anteras ovaladas, insertos en la mitad del tubo de la corola, generalmente inclusos; ovario globoso, bilocular, con un óvulo por lóbulo, estilo breve, estigma brevemente bilocado, oblicuo o recto; frutos parciales 2, pequeños, secos, envueltos por el cáliz persistente, separables fácilmente en la madurez, de paredes papiráceas o subóseas (Royal Botanic Garden, 2006).

5.6.4 Fenología de *L. graveolens*

Planta perenne cuyo follaje rebrota en el verano después de haber sido aprovechada durante el otoño del ciclo anterior. Se observa en floración desde principios del mes de julio hasta octubre. A lo largo de su área de distribución, época asociada con mayores precipitaciones. Hernández (1991) en el altiplano potosino *L. graveolens* se manifiesta a principios del verano, con el mayor desarrollo foliar en agosto y septiembre; ahí, aparentemente la producción de hojas está determinada por la combinación de ausencia de heladas y la presencia de precipitaciones. La floración y fructificación se da también en agosto y septiembre. La semilla se cosecha comúnmente durante el mes de septiembre previo al aprovechamiento de la hoja (Castillo, 1991).

5.6.5 Clasificación taxonómica de *L. graveolens*

REINO: Vegetal

SUBDIVISION: Angiospermae

CLASE: Dicotildoneas

ORDEN: Tubiflorae

FAMILIA: Verbenáceas

GENERO: *Lippia*,

ESPECIE: *graveolens* sin. *Berlandieri*

5.6.6 Habitat de *L. graveolens*

El intervalo altitudinal que ocupa *L. graveolens* va desde el nivel del mar hasta los 2300 msnm; en el desierto chihuahuense se establecen en sitios entre los 1200 y los 2300 msnm, en sitios áridos y semiáridos. Sus poblaciones con hojas de fuerte aroma se localizan en Jalisco, Zacatecas, Durango, Coahuila y San Luis Potosí. El clima, que se clasifica como BW(h)W(c), preferentemente del tipo seco y semiseco, con temperaturas que varían de 20 a 24°C y una precipitación que va de 182 a 267 mm. En el matorral micrófilo y rosetófilo su hábitat se localiza en mesetas, planicies, cerros, lomeríos, laderas, arroyos y cañadas poco accesibles de suelos alcalinos, con pH de 7.3 a 8.5, en general pedregosos, de textura franco-arenosa dentro de un intervalo altitudinal que va desde 400 hasta 2000 msnm, su mayor abundancia se presenta entre 1000 y 1800 msnm. También se desarrollan poblaciones en suelos con textura ligera (Huerta, 2005; Villavicencio et al., 2007), con pH: 5.8 – 6.5 y de 3.0 a 4.5% de materia orgánica.

Las poblaciones de *L. graveolens*, del sur y sureste de México, se establecen sobre todo en el bosque tropical caducifolio, pero también se presentan en matorrales de cactáceas columnares, bosques de encino-enebro, *Brahea* y en selva mediana subcaducifolia. En las zonas áridas de Tamaulipas e Hidalgo la especie se desarrolla en matorrales espinosos y chaparrales. En las zonas tropicales más húmedas, *L. graveolens* se distribuye en la vegetación secundaria derivada del bosque tropical subperennifolio. En zonas más secas, como la cuenca del río Balsas y el valle de Tehuacán, es uno de los arbustos más comunes de la vegetación primaria.

Las poblaciones de *L. graveolens* del desierto chihuahuense forman parte del matorral rosetófilo donde *Condalia*, ocotillo (*Fouquieria splendens*), lechuguilla (*Agave lechuguilla*), maguey cenizo (*Agave sperrima*), huizache (*Acacia berlandieri*), huizachillo (*Acacia crassifolia*), trompillo (*Solanum laeagnifolium*), mezquite (*Prosopis glandulosa*), jarilla (*Viguiera stenoloba*), uña de gato (*Mimosa* spp.) son abundantes. En el sureste de Coahuila, *L. graveolens* se establece en matorrales micrófilos y matorrales rosetófilos. En los primeros, *L. graveolens*, *Larrea tridentata*, *Viguiera stenoloba* y *Flourensia cernua* son los arbustos dominantes. En el matorral rosetófilo, *L. graveolens*, *Leucophyllum frutescens*, *Zexmenia brevifolia*, *Hechtia glomerata* y *A. lechuguilla* son las especies dominantes (Castillo, 1991). En el altiplano de San Luis Potosí se observa a *L. graveolens* en matorrales rosetófilos con *A. lechuguilla* y *Hechtia glomerata*; además crece en matorrales submontanos (Hernández, 1991). En tanto que, hacia el norte de Jalisco, se establece en matorrales subinermes donde es la especie arbustiva dominante y se asocia con: *Bouteloua filiformis*, *B. curtipendula*, *Rhynchelitrum repens*, *Botriochloa saccharoides*, *Muhlenbergia monticola*, *Aristida adscencionis*, *Mimosa biuncifera*, *Stevia rhombifolia*, *Brickelia veronicaefolia*, *Agave* spp., *Ipomoea intrapilosa*, *Acacia farnesiana*, *A. schaffneri*, *Bursera fagaroides* y *Ptelea trifoliata* (Cavazos, 1991).

5.6.7 Distribución de *L. graveolens*

La distribución general de esta especie abarca Estados Unidos (sur de Texas), México, Belice, Guatemala, El Salvador, Honduras Nicaragua y Costa Rica. En México, los principales

estados productores son Chihuahua, Durango, Nuevo León, Coahuila, Zacatecas, San Luis Potosí, Puebla y Jalisco.

5.6.8 Recolección y aprovechamiento de *L. graveolens*

En condiciones naturales la época de recolecta es corta y depende de la temporada de lluvias. Después de las primeras lluvias el arbusto rebrota y crece el follaje el cual puede recolectarse de agosto a octubre, o bien hasta que se presenten las primeras heladas. El periodo de aprovechamiento generalmente comprende de tres a cuatro meses. El follaje, en general, se seca en condiciones de media sombra para después “desvarar” o separar las hojas de las ramas, esta fase se denomina “orégano en greña”. Se pueden utilizar máquinas cribadoras para hacer una limpieza de impurezas y clasificar el producto de acuerdo a su tamaño, seleccionando las hojas de acuerdo a tres categorías: hoja entera, media y molida (Villavicencio et al., 2007)

5.6.9 Productividad de *L. graveolens*

La productividad del recurso varía dependiendo la zona agroecológica y del número de plantas aprovechables por hectárea. En condiciones semiáridas, se puede obtener un rendimiento de 0.30 ton/ha de hoja seca. En Jalisco, en sitios donde existe aprovechamiento, la producción de hoja seca es de 0.102 a 0.389 ton/ha (Cavazos, 1991). En sitios de San Luis

Potosí, la producción de hojas secas es de 0.019 – 0.030 ton/ha lo cual indica una gran variación en la productividad del arbusto en su extensa área de distribución. (Hernández, 1991). Para el caso de las plantaciones comerciales bajo riego, se cosechan de 3 a 5 ton/ha de hoja seca de orégano por ciclo.

5.6.10 Comercialización de *L. graveolens*

El volumen de producción del orégano mexicano ha llegado a ser de 2559 ton anuales, lo que ha representado un valor monetario de 3.2 millones de dólares (Sánchez et al., 2001). Esta planta tiene una gran demanda a nivel mundial. Los principales países importadores de Europa son Alemania, Italia, Grecia, Francia y España. Además de los Estados Unidos, los principales países exportadores son Turquía (61.8%) y México (30.6%) entre ellos cubren más del 90% de abastecimiento (Arizio y Curioni, 2003). Sin embargo, a pesar de su producción y calidad, su aprovechamiento coincide con el periodo de floración de la planta, limitando la formación de frutos y semillas, lo que limita su reproducción natural (Ocampo-Velázquez et al., 2009). Para tratar de evitar lo anterior, en México existen dependencias como el Centro de Investigación para los Recursos Naturales (CIRENa), donde han establecido la metodología para desarrollar orégano como cultivo y la extracción del aceite esencial como una alternativa de producción agrícola sustentable (Jacinto et al., 2007).

5.6.11 Métodos de extracción y análisis de aceites esenciales

Los métodos convencionales utilizados para la extracción de aceites esenciales son la destilación con arrastre de vapor y el uso de solventes orgánicos. Últimamente ha crecido el interés por la extracción supercrítica y subcrítica con dióxido de carbono como solvente. Este gas es ideal ya que no es tóxico ni explosivo y es fácil de remover de los productos extraídos (Thomann et al., 1993; Simándi et al., 1998). Los rendimientos de extracción generalmente van desde el 1.8% (McGimpsey, 1993) hasta el 5.6%. En cuanto a su composición se han logrado identificar hasta 56 compuestos, y se han encontrado diferencias cuantitativamente significativas en sólo dos fenoles isoméricos, carvacrol (0.1-56.6%) o fenol no-cristalizable y timol (7.9-53.6%) o fenol cristalizable; incluyéndose sus precursores biosintéticos el Y-terpineno y el p-cimeno (Russo et al., 1998).

5.6.12 Compuestos químicos de *L. graveolens*

En el aceite esencial del orégano mexicano (*Lippia graveolens* H.B.K.), se han identificado 33 compuestos que incluyen alcoholes, éteres, fenoles y una cetona. Los componentes mayoritarios son timol, carvacrol, β -mirceno, α -terpineno, y-terpineno y p-cimeno (Figura 4). Timol es el componente principal que representa del 40 al 60% del total de los compuestos volátiles, mientras que del 5 al 25% corresponde a carvacrol (Lawrence, 1984; Uribe-Hernández et al., 1992). Otros autores mencionan que estos compuestos se encuentran

en concentraciones entre 20-40%, (Yousif et al., 2000) y que timol, carvacrol, *p*-cimeno, 1,8-cineol y γ -terpineno contribuyen con un 63 a 69% (w/w) del aceite (Silva y Dunford, 2005).

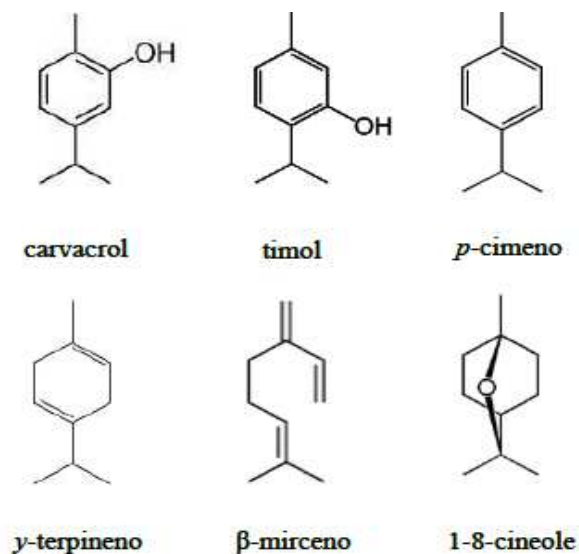


Figura 2. Estructura química de los componentes mayoritarios del aceite esencial de *Lippia graveoleens* H.B.K.

5.7 Actividad biológica de los componentes de orégano

5.7.1 Capacidad Antioxidante

El efecto antioxidante de las plantas aromáticas se debe a la presencia de grupos hidroxilo en los compuestos fenólicos. Entre las diferentes variedades de orégano se han encontrado altos niveles de antioxidantes (>140 mmol/100 g) (Dragland et al., 2003). El

potencial antioxidante de los extractos de orégano ha sido determinado por su capacidad para inhibir la peroxidación lipídica, protegiendo al ADN del daño por radicales hidroxilo, con los métodos de atrapamiento de peróxido de hidrógeno, atrapamiento de HOCl y por la prueba de la rancidez. En todas estas pruebas, los extractos de orégano han mostrado ser efectivos, en algunos casos a niveles superiores a los exhibidos por el propil galato, BHT y BHA (Martínez-Tomé et al., 2001). Sin embargo, sus aplicaciones industriales son limitadas debido al aroma y sabor que pueden conferir a los alimentos donde se aplicarían, por lo que se requiere de investigación en procesos de deodorización (Moure et al., 2001). La actividad antioxidante depende del tipo y polaridad del solvente extractante; por ejemplo, los antioxidantes obtenidos con agentes lipofílicos son más efectivos en emulsiones. El aceite esencial de *O. vulgare* tiene actividad anti-radical y esta propiedad se le atribuye a los monofenoles carvacrol y timol (Deighton et al., 1993). Varios investigadores confirman el potencial antioxidante de extractos y aceites esenciales de diferentes variedades de orégano (*O. vulgare*, *O. compactum*, *O. majorana*) (Baricevik et al., 2005; Madsen et al., 1996; Calucci et al., 2003).

En laboratorio se evaluó el potencial antioxidante del aceite esencial de orégano mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) obtenido de hojas secadas a la sombra y al sol. La mejor actividad antioxidante, con el método del β -caroteno, se obtuvo en el aceite que proviene de las hojas de orégano secadas a la sombra, mayor que el BHT (Lecona – Uribe et al., 2003)

Martinez et al., 2008 examinaron la capacidad antioxidante y propiedades antimutagenicas de extractos metanolicos de tres diferentes poblaciones de *Lippia graveolens* de México. Todos los extractos mostraron capacidad de atrapar radicales DPPH de manera dependiente del nivel de concentración; los valores de la CL_{50} se correlacionaron con el contenido fenólico. Ninguno de los extractos fue tóxico para las cepas de *Salmonella typhimurium* TA98 TA100; Además, los extractos en una concentración equivalente a 200 μ g de ácido gálico inhibieron la mutagenidad en 39 y 30% inducida con 4-nitro-O-fenilenildiamina y sodio, respectivamente. Los resultados sugieren que el orégano mexicano es un ingrediente polar bioactivo para usarse en la industria alimentaria.

Botsogou et al., (2003) investigaron los efectos del aceite esencial de *Origanum Vulgare hirtum* en la alimentación de pavos durante 12 semanas y suplementación de acetato de tocoferol en la estabilidad oxidativa de la carne almacenada y congelada a largo plazo. Se evaluó la oxidación de los lípidos en pechuga y muslo después de 1, 3, 6 y 9 meses de almacenamiento congelado a -20°C . Los resultados mostraron que el aceite de orégano aumentó la estabilidad oxidativa de la carne de pechuga y muslo durante el almacenamiento. El aceite de orégano en la dieta en el nivel de 200 mg kg^{-1} fue significativamente más eficaz para retrasar la oxidación de los lípidos en comparación con Acetato de tocoferol.

5.7.2 Capacidad antimicrobiana del orégano

Existen múltiples estudios sobre la actividad antimicrobiana de los extractos de diferentes tipos de orégano. Se ha encontrado que los aceites esenciales de las especies del género *Origanum* presentan actividad contra bacterias Gram negativas como *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Yersinia enterocolitica* y *Enterobacter cloacae*; y las Gram positivas como *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Listeria monocytogenes* y *Bacillus subtilis* (Aligiannis et al., 2001; Elgayyar et al., 2001). Tienen además capacidad antifúngica contra *Cándida albicans*, *C. tropicalis*, *Torulopsis glabrata*, *Aspergillus Níger*, *Geotrichum* y *Rhodotorula*; pero no contra *Pseudomonas aeruginosa* (Sivropoulou, et al., 1996).

Se ha evaluado la actividad antimicrobiana de los componentes aislados, así como el del aceite esencial. Los fenoles carvacrol y timol poseen los niveles más altos de actividad contra microorganismos Gram negativos, excepto para *P. aeruginosa*, siendo el timol más activo (Elgayyar et al., 2001; Sivropoulou, et al., 1996). Los valores de la concentración mínima inhibitoria (CMI) para los aceites esenciales se han establecido entre 0.28-1.27 mg/mL para bacterias, y de 0.65-1.27 mg/L para hongos (Aligiannis et al., 2001). El caso de *E. coli* O157:H7 existe una relación concentración/efecto a 625 mL/L con actividad bactericida después de 1 minuto de exposición al aceite, mientras que después de 5 minutos se requirieron 156 y 312 mL/L. Dicha acción antimicrobiana posiblemente se debe al efecto sobre los fosfolípidos de la capa externa de la membrana celular bacteriana,

provocando cambios en la composición de los ácidos grasos. Se ha informado que las células que crecen en concentraciones subletales de carvacrol, sintetizan dos fosfolípidos adicionales y omiten uno de los fosfolípidos originales (Burt and Reinders 2003; Ultee et al., 2000).

El extracto etanólico de una línea clonal de orégano inhibió la acción de *Listeria monocytogenes* en caldo y otros productos de carne (Saeberg et al., 2003). También se ha encontrado que el aceite esencial de orégano es muy activo en la inhibición de *E. coli* O157:H7 (Sagdic et al., 2002). Otros microorganismos como *Acinetobacter baumannii*, *Aeromonas veronii* biogroup *sobria*, *Candida albicans*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serotype *typhimurium*, *Serratia marcescens* and *Staphylococcus aureus*, se han logrado inhibir gracias a la presencia de extractos de orégano (2% v/v) (Hammer et al., 1999). Estos estudios tienen importantes implicaciones para la industria alimentaria.

5.7.3 Capacidad antimicrobiana del género *Lippia*

La cantidad de estudios efectuados para evaluar la capacidad antimicrobiana de las especies del género *Lippia* son menores a los realizados a las especies del género *Origanum*. A pesar de esto, el aceite esencial y algunos extractos de esta especie han sido

reconocidos como importantes agentes inhibidores de hongos y bacterias. Por ejemplo, el aceite esencial de *Lippia chevalieri*, *L. multiflora* y *L. graveolens* impiden el desarrollo de bacterias Gram-negativas (Bassole et al., 2003; Salgueiro et al., 2003). Otras investigaciones confirman que el extracto hexánico de *Lippia graveolens* H.B.K. presenta efectos antibacteriales contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas causantes de enfermedades gastrointestinales (Hernández et al., 2003) y que el extracto etanólico de *L. organoides* inhibe el desarrollo micelial de *Rhizoctonia solani* y *Bipolaris maydis*, dos hongos que atacan el maíz. Con una concentración de 1.5% se produce una inhibición total y al 0.5%, el grado de inhibición es de 70 y 84% para *R. solani* y *B. maydis* respectivamente (Rodríguez y Sanabria, 2005). Por otra parte, Portillo-Ruiz et al., (2005) demostraron la actividad antifúngica *L. berlandieri* Schauer contra hongos contaminantes de alimentos, y Paredes et al., (2007) contra diferentes especies de *Vibrio*. También, se ha reportado su actividad antibacterial contra *E. coli*, *S. aureus* y *B. cereus* (Avila-Sosa et al., 2010). Cabe mencionar que el aceite esencial de *L. graveolens* H.B.K. presenta una alta actividad antifúngica ($IC_{50} = 10-90 \mu g mL^{-1}$) contra *A. niger*, *F. moniliforme*, *F. sporotrichum*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Rhizoctonia solani* (Hernández et al., 2008) así como contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *Sarcina lutea*, *B. subtilis*, *Shigella boydii*, *Salmonella typhi*, *Yersinia enterocolitica*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter aerogenes* *E. coli* y cuatro cepas de *Vibrio cholerae* aisladas de agua y muestras clínicas (MIC y MBC de 7-125 y 15-258 $\mu g mL^{-1}$) (Hernández et al., 2009).

En estudios recientes con *Lippia graveolens*, se estudió la composición química y la actividad antimicrobiana del aceite esencial (AE) de *Lippia palmeri* S. Wats, colectada en

dos localidades del Estado de Sonora, México. La actividad antimicrobiana de los AE contra cuatro bacterias Gram-positivas y seis bacterias Gram-negativas varió con respecto al origen de la planta. Sin embargo, ambos AE mostraron mayor actividad contra *Escherichia coli* O157:H7 y *Staphylococcus aureus*. Este es el primer reporte de la caracterización aceite del aceite esencial de *L. palmeri*, y estos resultados apoyan el concepto de que pueden ser utilizados para preservarse alimentos. (Ortega et al., 2011).

5.7.3.1 Capacidad antimicrobiana de timol y carvacrol

Con los compuestos fenólicos timol y carvacrol se evaluó el efecto bactericida de carvacrol en *Bacillus cereus* transmitida por patógenos a los alimentos demostrando inhibición de crecimiento en concentraciones de $0,75 \text{ mmol L}^{-1}$. (Ben Arfa, et al., 2006) evaluaron la actividad antimicrobial de carvacrol, eugenol y mentol en bacterias *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum*, *Bacillus subtilis*, levadura *Saccharomyces cerevisiae* y el hongo *Botrytis cinerea*. El resultado mostró al carvacrol como el más efectivo compuesto hidrofóbico. Kim et al., 1995 investigaron el efecto de carvacrol citral y carvacrol contra *Salmonella typhimurium* carvacrol demostró mayor potencia con CMI a 250 mg/mL, por lo que es recomendable su aplicación como agente antibacteriano en los sistemas de alimentación. (Xu et al., 2008) investigaron los mecanismos antibacterianos de timol y carvacrol ante *Escherichia coli* los resultados de la curva de letalidad demostraron que carvacrol y timol a 200 mgL^{-1} inhibieron el crecimiento, el efecto antibacteriano se atribuyó a su capacidad

para permeabilizar y despolarizar la membrana citoplasmática, en estudios mas recientes (Martinez- Velazquez et al., 2011) evaluaron el efecto acaricida del aceite esencial de *Lippia graveolens* el resultado mostró una letalidad de 90- 100% la composicion química del aceite incluyó como componentes principales a timol 24.59 % y carvacrol 24.54 %. Azirak and Rencuzogularllari (2008) investigaron el efecto genotoxico de timol y carvacrol en la medula ósea de ratas en diferentes concentraciones e indujeron anomalías cromosómicas y reducción del índice mitótico. Melo et al., 2010 investigaron el efecto de carvacrol como ansiolítico administrado vía oral en ratones en dosis de 12.5, 25 y 50 mg/kg y encontraron efectos positivos sin que el resultado afectara la actividad motora. Los mismos autores Melo et al., 2011 evaluaron el efecto de carvacrol como antidepresivo y encontraron resultados similares.

6 MÉTODOS

6.1 Material vegetal.

6.1.1 Identificación del material vegetal

Un ejemplar de la planta fue depositado e identificada en el herbario del departamento de botánica de la división de agronomía de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo, Coahuila, México y esta fue caracterizada como *Lippia graveolens* Humboldt. Bonpland. Kunth. para ello se asignó el número de control 87457, el origen de la planta fue el invernadero localizado en el Campus de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en el municipio de Saltillo, Coahuila, comprendido en las coordenadas geográficas 25° 27' latitud norte, 101° 02' longitud oeste y a una altitud de 1610 msnm.

6.1.2 Preparación y manejo del material experimental

Una vez que alcanzaron una altura de 30 cm, se trasplantaron en macetas plásticas con capacidad de 16 L, usando como sustrato una mezcla comercial BERGER peat moss (80% turba, 10% de Perlita y 10% de vermiculita). Una vez trasplantadas, las plantas

alcanzaron un estado de tallos lañosos se podaron a 30 cm de altura, se aplicó a todo el material solución nutritiva comercial para luego 10 d después iniciar con los tratamientos experimentales. Las plantas se regaron indistintamente cada 3d hasta concluida la fase experimental de campo.

6.1.3 Preparación y aplicación de las soluciones

Para la elaboración de las soluciones estresantes, se empleó NaCl, (PM 58.4 g/mol); $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (PM 285.7168 g/mol); y $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (PM 278.0157 g/mol) grado reactivo, estas se prepararon ajustado las cantidades a mM. El agua que se utilizó para regar de sistema de riego natural con un pH de 7.65 y una C.E. de 715 microS/cm. Las soluciones estresantes se aplicaron semanalmente según correspondió a cada tratamiento.

La solución nutritiva usada tiene el nombre comercial de Fertiplus tuvo los siguientes porcentajes de elementos nutritivos; N = 7.28, K_2O_2 = 14.07, Fe = 0.006, Zn = 0.002, S= 1.31, Mo = TRAZA, P_2O_2 = 8.21, Mg = 0.086; Cu = 0.001, Mn = 0.075, B = 0.002, Ca = 0.19. Para la elaboración de las soluciones se empleó NaCl, (PM58.4g/mol; $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (PM 285.7168 g/mol; y $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (PM 278.0157 g/mol; esta solución se aplicó en razón de 4ml/L agua natural/ planta/ semana en el tratamiento que correspondió a solución nutritiva comercial.

6.1.4 Distribución de tratamientos

Se seleccionaron 88 plantas, se distribuyeron en forma balanceada en base a un diseño completamente al azar con arreglo bifactorial con anidamiento de niveles de concentración en elementos estresantes, con el fin de evaluar cuatro condiciones o ambientes denominadas como factor B e identificadas como: B0= ambiente optimo, B1= ambiente natural, B2= ambiente con inducción de estrés moderado y B3= inducción de estrés intermedio, anidadas en tres elementos inductores de estrés, identificadas como factor A ($A1 = \text{NaCl}$, $A2 = \text{Cu}^{2+}$ y $A3 = \text{Fe}^{2+}$), la concentración evaluadas en los ambientes estresantes en niveles moderado e intermedio ubicadas en B2 y B3, se formularon en unidades mM de: (50.0 y 100.0 de NaCl), (3.0 y 6.0 de Cu^{2+}) y (2.5 y 5.0 de Fe^{2+}) respectivamente, las condiciones medio ambiente optimo y natural identificadas con B0 y B1 fueron: (solución nutritiva comercial fertiplus y agua natural) respectivamente, los cuales se mantuvieron fijos en cada elemento del factor A

Las soluciones se aplicaron según correspondía a cada tratamiento, cada semana. Las soluciones de Cu^{2+} , Fe^{2+} se aplicaron con una bomba de aspersión manual apunto de goteo. NaCl y solución nutritiva fueron directamente administradas al sustrato con una regadera tipo jardín en un volumen de 1.5 L/planta. Se aplicó riego en todos los tratamientos cada 3 d a capacidad de campo.

6.1.5 Variables a evaluar

6.1.5.1 Biomasa

Se tomaron ocho plantas de cada tratamiento, a las cuales se les separaron las hojas, los brotes, los tallos y las raíces y se pesaron inmediatamente para obtener el peso fresco, para lo cual se utilizó una balanza analítica digital OHAUS modelo TS120, posteriormente este material vegetal se secó con aire caliente a 65°C durante 24 h para obtener el peso seco mediante el uso de una estufa MAPSA modelo HDP334. Para área foliar y número de hojas se usaron tres plantas por tratamiento, se defoliaron y se contabilizaron sus hojas, se utilizó un medidor de área foliar portátil, marca LI-cor. Modelo LI-3000A.

6.1.5.2 Aceite esencial

El contenido fue determinado en las 3 plantas utilizadas para área foliar, el material fue triturado con un Molino THOMSOM modelo 3383-L10. Posteriormente se procedió a la extracción de aceite esencial por la técnica de destilación por arrastre de vapor (AOAC, 1990).

6.1.5.3 Timol y carvacrol

La identificación de los componentes se llevó a cabo por análisis de cromatografía de gases - Espectrometría de masas (GC/MS) en un HP 6890 acoplado a un HP 5972 MSD (con rango de masa m/z 50-550) y un Agilent DB-5MS de columna capilar de (30 m × 0,25mm) con un espesor de 0,25 μ de película. El gas acarreador usado fue helio. El

programa de temperatura inicial fue 60°C. min, la temperatura final fue de 280°. Con un gradiente de 9 °C/min.

Los índices de retención (IR) para la identificación de los compuestos fue determinada sobre las bases de homólogos n- alcanos hidrocarbonados bajo las mismas condiciones, el reactivo fenchone fue usado como estándar a una concentración de 0.01 mg/mL de diclorometano, la composición fue obtenida por el área normalizada y la respuesta para cada factor fue considerado como 1, los compuestos fueron identificados por comparación de (IR) y espectro de masas de acuerdo con los datos publicados por Adams (1995) y McLafferty (1989). Con las áreas de cada muestra se obtuvo la concentración en ppm de timol y carvacrol mediante la siguiente fórmula:

$$Y = 2.9693x - 2.6052$$

$$r^2 = 0.9168$$

$$X = Y + 2.6052 / 2.9693$$

En donde:

Y = área o superficie obtenida en el cromatograma

X= concentración en ppm de timol y carvacrol

6.1.5.4 Determinación de prolina

Esta se realizó en follaje y raíz en base al análisis propuesto por Bates et al., 1973. 0.5 g de hoja o raíz se maceraron en 10 mL en una solución acuosa de ácido sulfosalicílico al 3% peso/volumen y posteriormente se sonicó por 5 min y se filtró la solución en un embudo de filtración rápida utilizando papel Whatman No. 2. Una alícuota (2 mL) se colocó en un tubo de ensaye al que se le agregaron 2 mL de ácido ninhídrinico y 2 mL de ácido acético glacial para después colocar el tubo a una temperatura de 100°C durante 1 h. Finalmente la reacción se terminó en un baño de hielo. Se agregaron 4 mL de tolueno y el contenido del tubo se mezcló vigorosamente durante 20 s. Posteriormente se aspiró la parte de tolueno con una pipeta, se estabilizó a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia ($\lambda = 520 \text{ nm}$) en un espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER-690. Se usó tolueno como blanco para calibrar el aparato. La concentración de prolina se determinó a partir de una curva de calibración y se calculó en base a peso fresco de la siguiente manera:

$$\frac{\text{ppm de prolina de la curva}}{\text{g de material, peso fresco}} \times (\text{volumen de aforación}) = \text{ppm de prolina}$$

6.1.5.5 Análisis de clorofila

Para el análisis de clorofila se colectaron hojas de cada tratamiento las cuales fueron maceradas en mortero de acuerdo a la metodología propuesta por (Menéndez et al., 2009). Las hojas colectadas se picaron finamente para después colocarlas en un vaso de precipitado de 50 ml, se agregó acetona al 85% hasta cubrir la muestra para después taparla con papel aluminio y se dejó reposar en el refrigerador por 24 h. Posteriormente se colocaron en un mortero, se trituraron y se colocaron en un matraz de aforación de 100 ml filtrándose mediante un filtro de gasa. En seguida el material se trituro en cuatro porciones, se lavaron con acetona al 85%. En seguidas se filtraron a través de la gasa y el filtrado se aforo en un matraz de 100 ml con acetona. La porción aforada de se colocó en una celdilla de un espectrofotómetro (CE-5502 análisis DoubleBeam UV) y se tomo la lectura absorbancia en % a una longitud de onda de 642.5 y 660 nm, utilizando como blanco acetona al 85%. Los cálculos del contenido de clorofila se hicieron en base a la formula siguiente

$$\text{Clorofila total} = (7.12 * \% \text{ Abs}_{660}) + (16.8 * \% \text{ Abs}_{642.5 \text{ nm}}) / 10 * P$$

Donde:

% Abs = % de absorbancia

Subíndices (643.5nm y 660 nm) = Longitud de onda en nanómetros

P = Peso de la muestra

*Multiplicado por

6.1.5.6. Fisiología fotosintética

Se llevó a cabo en dos ocasiones durante la temporada de crecimiento con equipo de LI6400 LICOR, INC., se eligieron tres plantas al azar de cada tratamiento y en un día soleado sin nubosidad se midió la asimilación de CO₂ en las hojas mas jóvenes de una rama orientada hacia el oriente, en dos ocasiones por planta ente las 10:00 y las 12:00 h para la toma de lecturas.

6.1.5.7 Obtención de impresiones para el estudio estomático

Se eligieron tres plantas al azar por tratamiento con 2 repeticiones de cada uno, teniendo en total 48 muestras. En cada planta se tomaron impresiones foliares en el haz de la hoja totalmente expandida con orientación hacia el oriente utilizando cemento PVC común transparente. El cemento en forma liquida se aplicó sobre la superficie foliar y se dejó secar. La muestra se extrajo con un trozo de cinta adhesiva transparente, la cual se adhiere posteriormente sobre un portaobjetos de vidrio y se realizó la observación al microscopio (Laboratorio de Citogenética, Departamento de Fitomejoramiento de la UAAAN). En cada impresión foliar se realizaron conteos de estomas en 3 campos en el microscopio con un aumento de 40 X. Para calcular la densidad estomática, después de hacer el conteo de estomas en 3 campos, se utiliza una formula que consiste en dividir el promedio del número de estomas observados entre

el área del portaobjeto del microscopio (0.049 mm) obteniéndose de esta forma la densidad estomática para cada tratamiento.

6.1.5.8 Análisis estadístico

A los datos obtenidos se les realizó análisis de varianza en base a un modelo bifactorial anidados de ambientes (factor B) en elemento estresantes (factor A), por medio del paquete estadístico SAS 9.2 (SAS Institute, 2009). Las diferencias estadísticas de medias de los factores por DMS ($P \leq 0.05$), empleando el paquete estadístico de FAUANL. Ver 1,4 Olivares (1989). Además se realizaron análisis correlaciones entre las variables evaluadas para lo cual se utilizó el paquete STATISTICA 6.0.

7. RESULTADOS

7.1 Producción de Biomasa

Los ambientes inducidos con elementos expusieron diferencias significativas en peso fresco y número de hojas (Tabla II).

TABLA II

Producción de biomasa en diferentes ambientes inducidos con elementos estresantes en *Lippia graveolens* H.B.K.

Elementos factor (A)	Ambientes factor (B)	Soluciones inductoras	Peso fresco g/planta	Peso seco g/planta	No hojas
NaCl	B0	Sol nutritiva	158.12 ^a	74.62 ^a	1727 ^a
	B1	Agua natural	156.85 ^a	72.87 ^a	1536 ^a
	B2	50.0 mM	125.87 ^b	64.50 ^a	1070 ^{ab}
	B3	100.0 mM	110.87 ^b	56.25 ^a	988 ^a
Cu ²⁺	B0	Sol nutritiva	158.12 ^a	74.62 ^a	1727 ^a
	B1	Agua natural	156.85 ^{ab}	72.87 ^a	1536 ^a
	B2	3.0 mM	171 ^a	63.87 ^a	1537 ^a
	B3	6.0 mM	138.5 ^b	66.12 ^a	1756 ^a
Fe ²⁺	B0	Sol nutritiva	158.12 ^a	74.62 ^a	1727 ^a
	B1	Agua natural	156.85 ^a	72.87 ^a	1536 ^a
	B2	2.5 mM	139.80 ^b	68.35 ^a	1334 ^a
	B3	5.0 mM	128.12 ^b	83.25 ^a	1594 ^a

Diferentes letras indican diferencias estadísticas (DMS $p \leq 0.05$)

Las condiciones de estrés inducidas con los tres elementos en la condición ambiental de estrés B3 redujeron en forma general la producción de biomasa.

La solución salina de 100.0 mM de NaCl en la condición ambiental B3 afectó negativamente el peso en fresco al producir el valor mas bajo con 110.9 g/planta, lo que significó una reducción de alrededor de 20 y 30 g/planta comparativamente con los ambientes sin inducción de estrés B0 y B1. Las condiciones de salinidad con 50.0 y 100.0 mM afectó negativamente el numero de hojas, al producir 38.1 y 42.8% menos hojas respectivamente con relación al ambiente bajo solución nutritiva (B0), y una reducción de 31 y 33% hojas comparativamente con el ambiente de agua natural (B1). La producción del peso en seco no tuvo diferencias estadísticas.

Los resultados de los elementos del factor A dentro de las condiciones inducidas estresantes del factor B mostró diferencias estadísticas y se presentan en la Tabla III. El peso fresco y número de hojas por efecto de la inducción del elemento Cu^{2+} en el ambiente B2 produjo la mayor cantidad de biomasa con 171.0 g y 1756 hojas por planta lo que representa un incremento de 26 y 43 % mas peso y hojas respectivamente con relación a NaCl.

Los valores del factor A exhibieron diferencias significativas, el estrés inducido con Cu^{2+} y Fe^{2+} produjeron más peso fresco y hojas por planta que el promedio obtenido en condiciones de salinidad. (Figura 3 A y B).

TABLA III

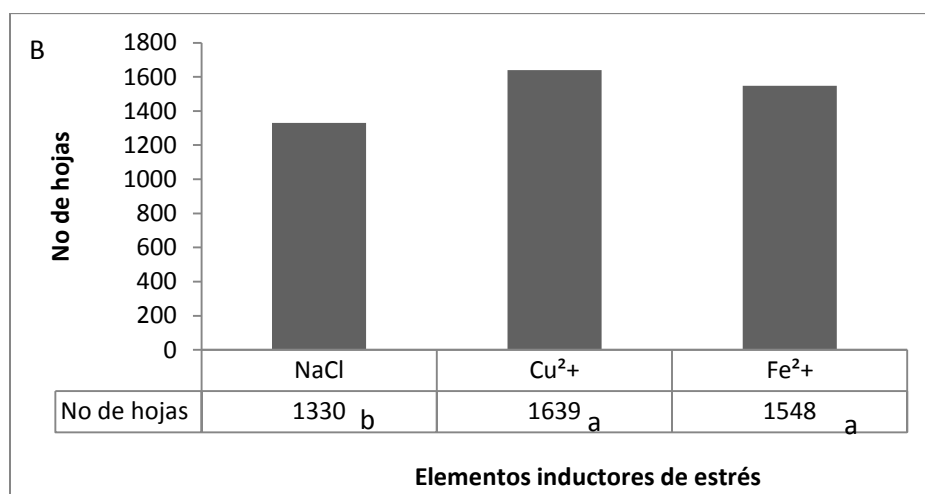
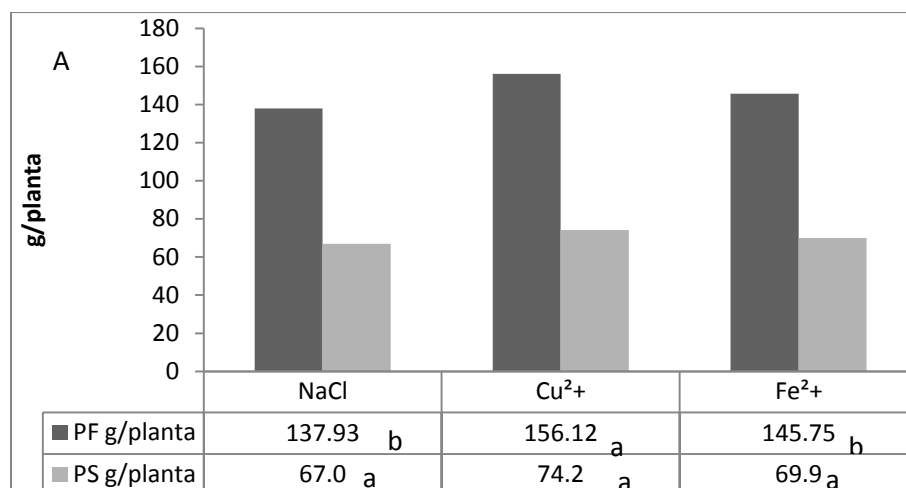
Producción de peso en fresco y numero de hojas por efecto de inducción de elementos en ambientes estresantes en *Lippia graveolens* H.B.K.

Ambientes factor (B)				
Elemento				
factor(A)	Sol nutri	Agua	B2	B3
Peso fresco				
g/planta				
NaCl	158.1 ^a	156.9 ^a	125.9 ^b	110.9 ^a
Cu ²⁺	158.1 ^a	156.9 ^a	171.0 ^a	138.5 ^a
Fe ²⁺	158.1 ^a	156.9 ^a	139.8 ^b	128.12 ^{a a}
Peso seco g/planta				
NaCl	74.62 ^a	72.87 ^a	64.50 ^a	56.25 ^a
Cu ²⁺	74.62 ^a	72.87 ^a	63.87 ^a	66.12 ^a
Fe ²⁺	74.62 ^a	72.87 ^a	83.25 ^a	68.35 ^a
No de hojas				
NaCl	1730 ^a	1537 ^a	1070 ^a	988 ^b
Cu ²⁺	1731 ^a	1538 ^a	1536 ^a	1756 ^a
Fe ²⁺	1732 ^a	1539 ^a	1334 ^a	1548 ^a

Diferentes letras indican diferencias estadísticas (DMS $p \leq 0.05$)

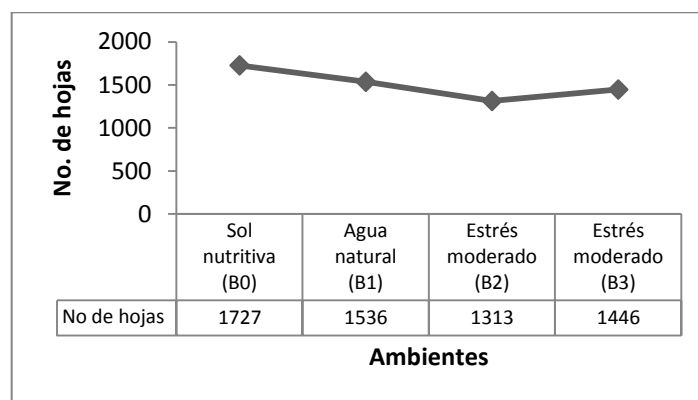
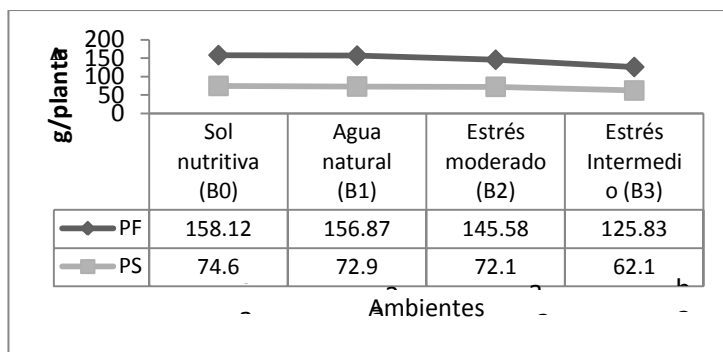
B2 = NaCl 50.0, Cu²⁺ 3.0, Fe²⁺ 2.0 mM; B3 = NaCl 100.0, Cu²⁺ 6.0, Fe 5.0

Los valores promedio de los ambientes del factor B, expusieron diferencias significativas, en peso fresco y número de hojas en las condiciones óptimas y normales superaron a las plantas bajo condiciones estresantes B2 y B3. (Figura 4 A y B).



Diferentes letras indican diferencias estadísticas (DMS $p \leq 0.05$)

Figura 3 Producción promedio de peso fresco y seco (A) y número de hojas (B) con elementos inducidos en *Lippia graveolens* H.B.K.



Diferentes letras indican diferencias estadísticas (DMS $p \leq 0.05$)

B2 = NaCl 50.0, Cu^{2+} 3.0, Fe^{2+} 2.0 mM; B3 = NaCl 100.0, Cu^{2+} 6.0, Fe 5.0

Figura 4. Producción promedio de peso fresco y seco (A) y número de hojas (B) en ambientes estresantes inducidos en *Lippia graveolens* H.B.K.

7.2 Producción de Aceite esencial

El análisis estadístico de la producción de aceite esencial fue estadísticamente significativo, el efecto generador de estrés del factor B con los tres elementos indujeron más producción de aceite esencial que los ambientes sin estrés. El elemento Fe^{2+} en concentración de 2.5 y 5.0 mM, produjeron mayor cantidad de aceite con 1.23 y 1.26 %

respectivamente superando por mas del doble a la producción obtenida en condiciones sin estrés. Los resultados se presentan en la tabla IV.

TABLA IV

Producción de aceite esencial en diferentes ambientes inducidos con elementos estresantes en *Lippia graveolens* H.B.K.

Elementos factor (A)	Ambientes factor (B)	Soluciones inductoras	(%) Aceite esencial
NaCl	B0	Sol nut.	0.52 ^b
	B1	Agua	0.50 ^b
	B2	50.0 mM	0.77 ^a
	B3	100.0 mM	0.67 ^a
Cu ²⁺	B0	Sol nut.	0.52 ^b
	B1	Agua	0.50 ^b
	B2	3.0 mM	0.79 ^a
	B3	6.0 mM	0.82 ^a
Fe ²⁺	B0	Sol nut.	0.52 ^b
	B1	Agua	0.50 ^b
	B2	2.5 mM	1.20 ^a
	B3	5.0 mM	1.26 ^a

Diferentes letras indican diferencias estadísticas (DMS $p \leq 0.05$)

El efecto de los elementos anidados en los ambientes B fueron diferentes estadísticamente en las condiciones inducidas de estrés (Tabla V), en el ambiente B2 el elemento Fe²⁺ superó en alrededor de un 36% a los elementos NaCl y Cu²⁺, igualmente en las condiciones de B3 Fe²⁺ fue superior.

TABLA V

Producción de aceite esencial por efecto de inducción de estrés con elementos en ambientes en *Lippia graveolens* H.B.K.

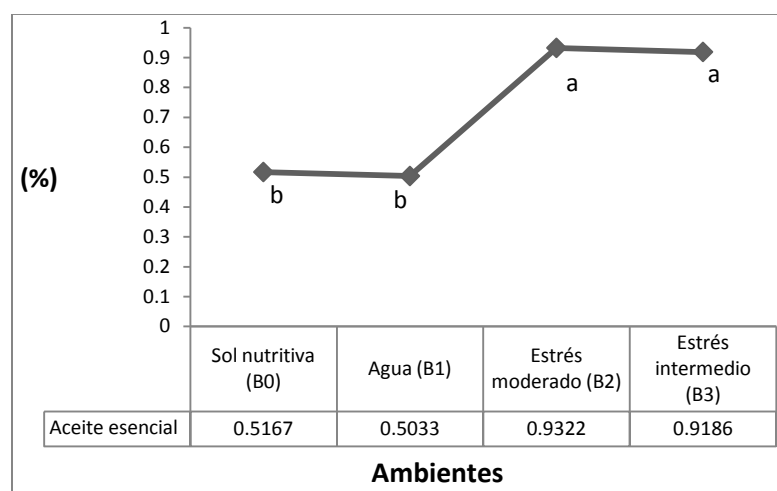
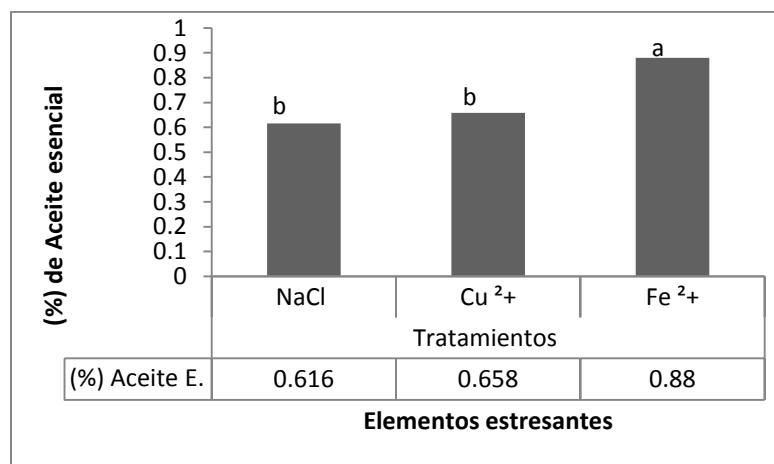
Elementos factor (A)	Sol nutritiva	Ambientes factor (B)		
		Agua natural	B2	B3
NaCl	0.517 ^a	0.5033 ^a	0.770 ^b	0.672 ^c
Cu ²⁺	0.517 ^a	0.5033 ^a	0.793 ^b	0.816 ^b
Fe ²⁺	0.517 ^a	0.5033 ^a	1.233 ^a	1.267 ^a

Diferentes letras indican diferencias estadísticas (DMS $p \leq 0.05$)

B2 = NaCl 50.0, Cu²⁺ 3.0, Fe²⁺ 2.0 mM; B3 = NaCl 100.0, Cu²⁺ 6.0, Fe 5.0

En los valores de los elementos del factor A se encontraron diferencias. Las plantas desarrolladas en el elemento Fe²⁺ acumularon 43 y 34 % más aceite que las plantas de los elementos de NaCl y Cu²⁺ respectivamente (Figura 5A).

Las condiciones inducidas de estrés en intensidad moderadas (B2) e intermedio (B3) produjeron en promedio 80 y 84 % mas que en los ambientes sin estrés (B0) sol nutritiva y (B1) agua respectivamente (Figura 5 B).



Diferentes letras indican diferencias estadísticas (DMS $p \leq 0.05$)
 B2 = NaCl 50.0, Cu²⁺ 3.0, Fe²⁺ 2.0 mM; B3 = NaCl 100.0, Cu²⁺ 6.0, Fe 5.0

Figura 5. Porcentaje promedio de aceite esencial por efecto de elementos estresantes (A) y ambientes de inducción (B) en *Lippia graveolens* H.B.K.

7.3 Producción de Timol y carvacrol

El efecto de la combinación de elemento, ambiente y soluciones inductoras tuvieron diferencias, para timol se encontró que el ambiente con solo agua (B1) obtuvo la mayor cantidad 46.0% en los elementos de NaCl y Fe^{2+} , pero no en Cu^{2+} donde la solución inductora de 3.0 mM obtuvo 63.05%.

TABLA VI

Producción de timol y carvacrol en diferentes ambientes con elementos inductores de estrés en *Lippia graveolens* H.B.K.

Elementos factor (A)	Ambientes factor (B)	Soluciones inductoras	Timol (%)	Carvacrol (%)
NaCl	B0	Sol nutritiva	5.43 ^c	9.57 ^a
	B1	Agua natural	46.05 ^a	0.58 ^b
	B2	50.0 mM	25.22 ^b	0.25 ^b
	B3	100.0 mM	22.95 ^b	0.23 ^b
Cu^{2+}	B0	Sol nutritiva	5.43 ^d	9.57 ^a
	B1	Agua natural	46.05 ^b	0.58 ^b
	B2	3.0 mM	63.05 ^a	0.51 ^b
	B3	6.0 mM	31.34 ^c	0.89 ^b
Fe^{2+}	B0	Sol nutritiva	5.43 ^c	9.57 ^b
	B1	Agua natural	46.05 ^a	0.58 ^d
	B2	2.5 mM	2.7 ^d	21.44 ^a
	B3	5.0 mM	25.14 ^b	3.95 ^c

Diferentes en indican diferencias estadísticas (DMS $p \leq 0.05$)

En carvacrol el mayor valor se observó en el elemento Fe^{2+} en concentración de 2.5 mM en el ambiente estresante B2 con 21.44% los resultados se presentan en el tabla VI.

El efecto de los elementos de los factores A en diferentes ambientes inductores de estrés B1 y B2, influyeron sobre el contenido de estos quimiotipos. Los elementos Cu^{2+} y Fe^{2+} mostrarón los mayores valores para timol y carvacrol respectivamente. también los valores logrados en la solución nutritiva en el ambiente B1 cuyos valores permanecieron fijos fueron elevados. Los resultados se presentan en la tabla VII.

TABLA VII

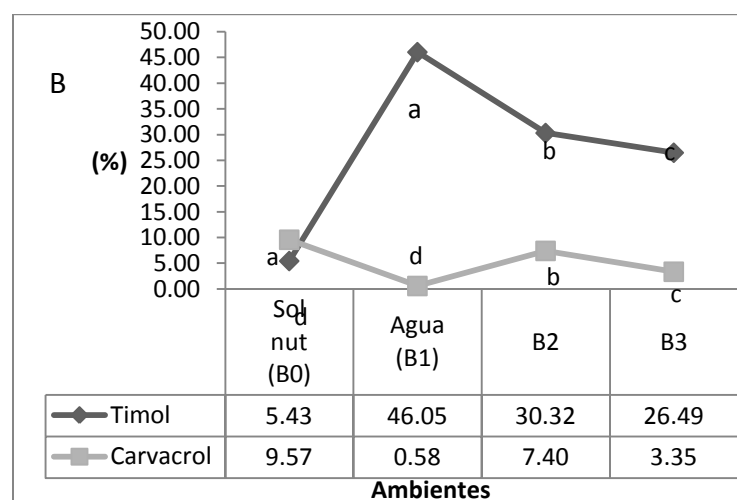
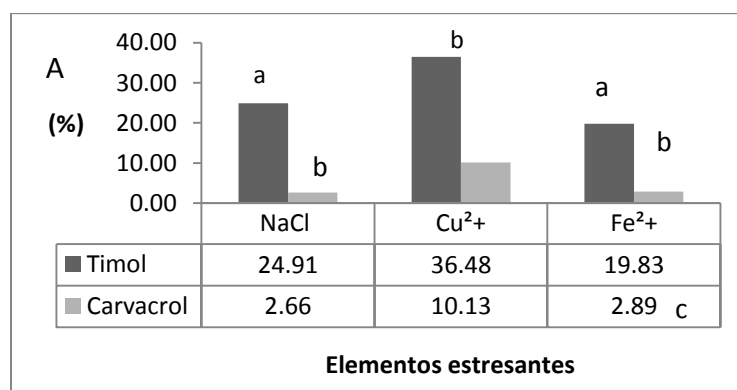
Producción de timol y carvacrol por efecto de elementos inductores en ambientes de estrés en *Lippia graveolens* H.B.K.

		Ambientes factor (B)			
	Elementos factor (A)	Sol nutri	Agua	B2	B3
Timol (%)	NaCl	5.43 ^a	46.04 ^a	25.22 ^b	22.95 ^b
	Cu^{2+}	5.43 ^a	46.04 ^a	63.05 ^a	31.38 ^a
	Fe^{2+}	5.43 ^a	46.04 ^a	2.70 ^c	25.14 ^b
Carvacrol (%)	NaCl	9.57 ^a	0.57 ^a	0.25 ^b	0.23 ^b
	Cu^{2+}	9.57 ^a	0.57 ^a	0.51 ^b	0.89 ^b
	Fe^{2+}	9.57 ^a	0.57 ^a	21.43 ^a	3.92 ^a

Diferentes letras indican diferencias estadísticas (DMS $p \leq 0.05$)

B2 = NaCl 50.0, Cu^{2+} 3.0, Fe^{2+} 2.0 mM; B3 = NaCl 100.0, Cu^{2+} 6.0, Fe 5.0

Los valores obtenidos del factor A, el elemento Cu^{2+} fue superior estadísticamente a los valores de NaCl y Fe^{2+} , mientras que el contenido de carvacrol, Fe^{2+} fue estadísticamente superior. Los valores se presentan en la figura 6 A.



Diferentes letras indican diferencias significativas (DMS ($p \leq 0.05$))

B2 = NaCl 50.0, Cu^{2+} 3.0, Fe^{2+} 2.0 mM; B3 = NaCl 100.0, Cu^{2+} 6.0, Fe 5.0

Figura 6. Acumulación promedio de timol y carvacrol por efecto de inducción con elementos (A) y ambiente estresante (B) en *Lippia graveolens* H.B.K.

En efecto del factor B, el ambiente con suministro de agua (B1) registró el mayor contenido de timol (46.47%), superando estadísticamente a los otros tres ambientes bajo estudio, mientras que el valor más alto de carvacrol, se obtuvo en la condición del ambiente de solución nutritiva (B0) con un promedio de 9.57%. Figura 6 B.

7.4 Acumulación de Prolina

Los valores de ambientes anidados en los elemento de prolina en follaje y raíz fue estadísticamente significativos. Las plantas bajo suministro de solución nutritiva acumularon mas prolina en el follaje que las plantas bajo estrés, a excepción de ambiente B2 con la inducción de Cu^{2+} en 3.0 Mm generando 242.00 ppm de prolina.

En la raíz fue mas frecuente encontrar valores altos de prolina, el elemento Cu^{2+} y NaCl en la condición B2 acumuló una cantidad de 213.6 y 176.66 ppm respectivamente, pero prevaleció un valor de prolina 192 ppm por efecto de la solución nutritiva. El mayor valor de prolina se logró con la inducción de 5.0 mM del elemento Fe^{2+} con un valor de 471 ppm superando a todos las condiciones ambientales de elementos bajo estudio. Los resultados se presentan la tabla VIII.

TABLA VIII

Prolina acumulada por efecto de diferentes condiciones ambientales con elementos inductores de estrés en *Lippia graveolens* H.B.K.

Elementos factor (A)	Ambientes factor (B)	Soluciones inductoras	Prolina follaje	Pollina raíz
NaCl	B0	Sol nutritiva	100.00 ^b	46.66 ^b
	B1	Agua natural	276.33 ^a	192.00 ^a
	B2	50.0 mM	33.66 ^c	176.66 ^a
	B3	100.0 mM	60.00 ^{b c}	12.66 ^c
Cu ²⁺	B0	Sol nutritiva	100.00 ^b	46.66 ^b
	B1	Agua natural	276.33 ^a	192.00 ^a
	B2	3.0 mM	242.00 ^a	213.66 ^a
	B3	6.0 mM	21.00 ^d	89.33 ^a
Fe ²⁺	B0	Sol nutritiva	100.00 ^b	46.66 ^b
	B1	Agua natural	276.33 ^a	192.00 ^{a a}
	B2	2.5 mM	43.00 ^c	27.00 ^c
	B3	5.0 mM	89.33 ^b	471.00 ^a

Diferentes letras indican diferencias significativas (DMS $p \leq 0.05$)

Las cantidades acumuladas en prolina por efecto de los elementos en el follaje fueron mayores en los elemento Cu²⁺ y Fe²⁺ en las condiciones B2 y B3 respectivamente, y en raíz ocurrió la misma situación salvo que el elemento NaCl fue estadísticamente similar a Cu²⁺ en el mismo ambiente B2. Los resultados se presentan en la tabla IX.

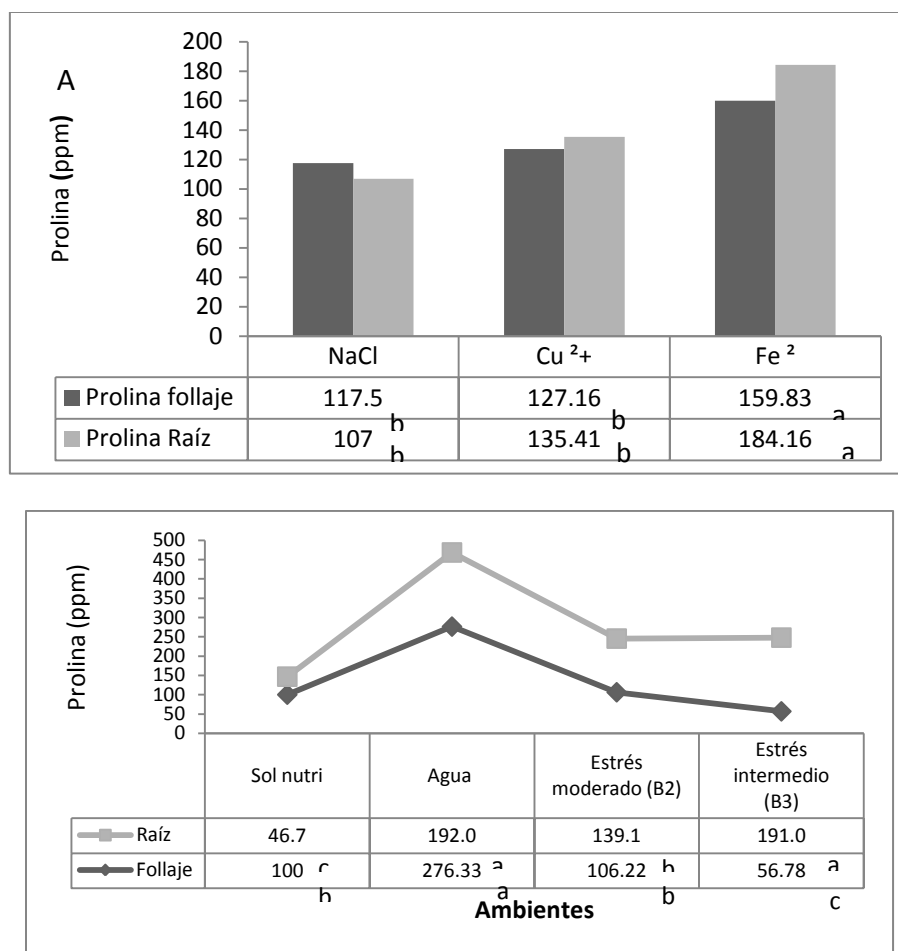
TABLA IX

Prolina acumulada por efecto de diferentes elementos inductores de estrés en ambientes en *Lippia graveolens* H.B.K.

Elementos factor (A)	Ambientes factor (B)			
	Sol nut.	Agua natural	B2	B3
Follaje				
NaCl	100.00 ^a	276.33 ^a	33.66 ^b	60.00 ^b
Cu ²⁺	100.00 ^a	276.33 ^a	242.00 ^a	21.00 ^b
Fe ²⁺	100.00 ^a	276.33 ^a	43.00 ^b	89.33 ^a
Raíz				
NaCl	46.66 ^a	192.00 ^a	176.66 ^a	12.66 ^c
Cu ²⁺	46.66 ^a	192.00 ^a	213.66 ^a	89.33 ^b
Fe ²⁺	46.66 ^a	192.00 ^a	27.00 ^b	471.00 ^a
Diferentes letras indican diferencias significativas (DMS p≤0.05)				

B2 = NaCl 50.0, Cu²⁺ 3.0, Fe²⁺ 2.0 mM; B3 = NaCl 100.0, Cu²⁺ 6.0, Fe 5.0

Los valores promedio del factor A tanto en follaje como en raíz presentaron diferencias estadísticas. El elemento estresante Fe²⁺ acumuló 159.8 ppm superando estadísticamente a Cu²⁺ y NaCl, en raíz también el elemento estresante Fe²⁺ acumuló la mayor cantidad con 184.16 ppm superando a los otros dos elementos. Fig. 7 A.



Diferentes letras indican diferencias significativas (DMS $p \leq 0.05$)

B2 = NaCl 50.0, Cu²⁺ 3.0, Fe²⁺ 2.0 mM; B3 = NaCl 100.0, Cu²⁺ 6.0, Fe 5.0

Figura 7. Prolina acumulada en promedio por efecto de elementos (A) y ambientes estresantes (B) en *Lippia graveolens* H.B.K.

La prolina en los ambientes del factor B en follaje y en raíz las plantas con suminitro agua la acumulación de prolina fue mayor con 192 y 276 ppm respectivamente. Figura 7 B.

7.5 Síntesis de clorofila

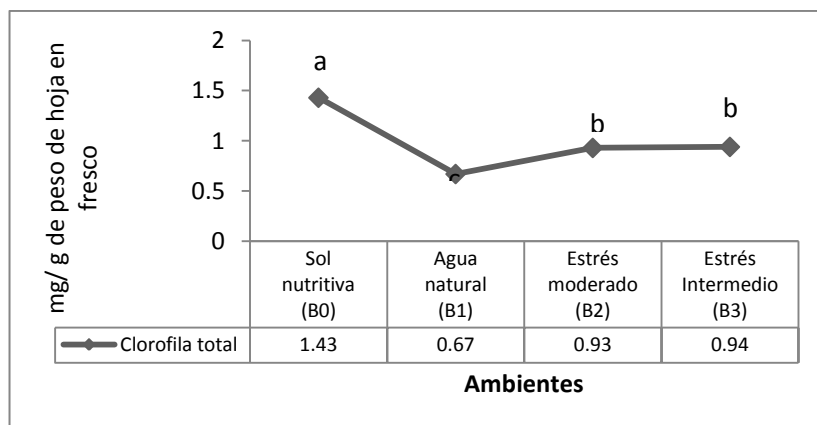
Los valores de clorofila de los ambientes anidados dentro de elementos estresantes expusieron diferencias estadísticas. El tratamiento sin estrés manejado a base de solución nutritiva acumuló un mayor margen de 0.40 a 0.73 mg/g de peso de la hoja a los que los ambientes de inducción de estreses con elementos salinos y iónicos.

TABLA X

Clorofila total acumulada por efecto de diferentes condiciones ambientales con elementos inductores de estrés en *Lippia graveolens* H.B.K.

Elementos factor (A)	Ambientes factor (B)	Concentración de soluciones	Clorofila mg/g de hoja en fresco
NaCl	B0	Sol nutritiva	1.40 ^a
	B1	Agua natural	0.67 ^b
	B2	50.0 mM	0.94 ^b
	B3	100.0 mM	0.95 ^b
Cu ²⁺	B0	Sol nutritiva	1.4 ^a
	B1	Agua natural	0.67 ^c
	B2	3.0 mM	0.95 ^b
	B3	6.0 mM	1.0 ^{a b}
Fe ²⁺	B0	Sol nutritiva	1.4 ^a
	B1	Agua natural	0.67 ^b
	B2	2.5 mM	0.90 ^b
	B3	5.0 mM	0.87 ^b

Diferentes letras en indican diferencias significativas (DMS $P > 0.05$)



Diferentes letras en indican diferencias significativas (DMS $P > 0.05$)

B2 = NaCl 50.0, Cu^{2+} 3.0, Fe^{2+} 2.0 mM; B3 = NaCl 100.0, Cu^{2+} 6.0, Fe 5.0

Figura 8. Síntesis de clorofila por efecto de elementos estresantes en diferentes intensidades de estrés en *Lippia graveolens* H.B.K.

La síntesis de clorofila no mostró diferencias entre los elementos del factor A pero si entre ambientes de intensidad de estrés del factor B. El tratamiento con suministro de nutrientes fue estadísticamente superior a las plantas bajo estrés en aproximadamente 35%. Las plantas con suministro con agua produjeron menos clorofila. Los resultados se presentan en la tabla XI.

TABLA XI

Síntesis de clorofila promedio por efecto de elementos y ambientes estresantes en *Lippia graveolens* H.B.K.

Elementos factor (A)	Clorofila mg/g de hoja en fresco
NaCl	1.006 ^a
Cu ²⁺	1.020 ^a
Fe ²⁺	0.975 ^a
Ambientes factor (B)	
Sol nutritiva (B0)	1.460 ^a
Agua natural (B1)	0.670 ^c
Estrés moderado (B2)	0.931 ^b
Estrés Intermedio (B3)	0.940 ^b

Diferentes letras indican diferencias significativas (DMS $P > 0.05$)

B2 = NaCl 50.0, Cu²⁺ 3.0, Fe²⁺ 2.0 mM; B3 = NaCl 100.0, Cu²⁺ 6.0, Fe 5.0

7.6 Densidad Estomática y Absorción de CO₂

Los resultados del efecto de las condiciones del factor B anidadas en los elementos estresantes del factor A, exponen valores contrastantes entre apertura estomática y asimilación de CO₂ observándose que el mayor número de estomas se presentó en los ambientes sin estrés que corresponden a B0 solución nutritiva y B1 agua natural, pero en la

asimilación de CO₂, los valores mas altos se obtuvieron en las condiciones estresantes. Los resultados se presentan en la tabla XII.

TABLA XII

Número de estomas y asimilación de CO₂ por efecto inducción de estrés con ambientes de elementos estresantes en *Lippia graveolens* H.B.K.

Elementos factor (A)	Ambientes factor (B)	Soluciones inductoras	Asimilación CO ₂	
			No. estomas	$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$
NaCl	B0	Sol nutritiva	81 ^a	24 ^{a b}
	B1	Agua natural	83 ^a	15 ^b
	B2	50.0 mM	62 ^{a b}	37 ^a
	B3	100.0 mM	57 ^b	35 ^a
Cu ²⁺	B0	Sol nutritiva	81 a	24 a b
	B1	Agua natural	83 a	15 b
	B2	3.0 mM	53 b	29 a
	B3	6.0 mM	52 b	31 a
Fe ²⁺	B0	Sol nutritiva	81 ^a	24 ^{a b}
	B1	Agua natural	83 ^a	15 ^b
	B2	2.5 mM	61 ^a	35 ^a
	B3	5.0 mM	75 ^a	24 ^{a b}

Diferentes letras en indican diferencias significativas (DMS P> 0.05)

El número de estomas en los elementos dentro de ambientes B2 y B3 no observaron diferencias estadísticas, a excepción de la condición inducida con 5.0 mM de Fe^{2+} (B3) en la cual mantuvo 26 % mayor apertura que Cu^{2+} y NaCl. Los resultados se presentan en la tabla XIII.

TABLA XIII

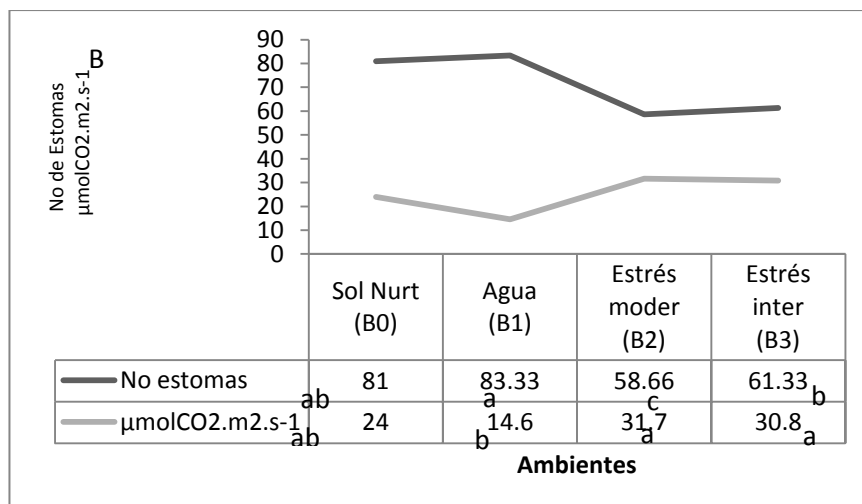
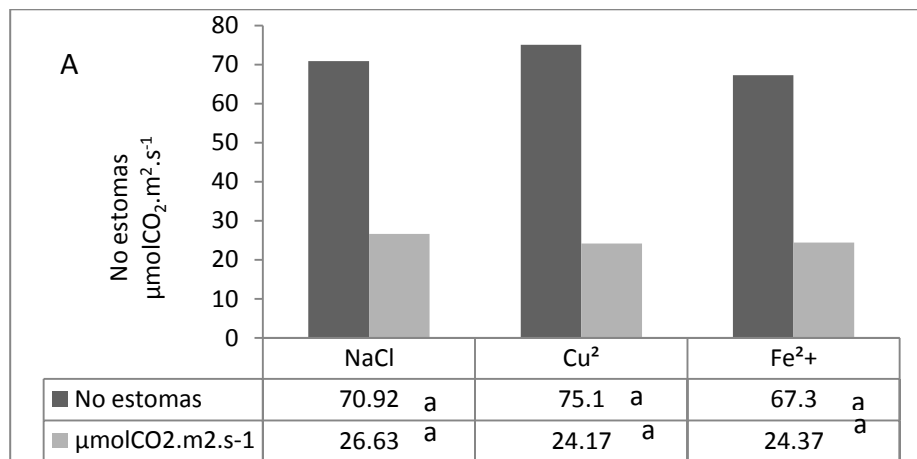
Número de estomas y asimilación de CO_2 por efecto inducción de estrés de elementos en ambientes estresantes en *Lippia graveolens* H.B.K.

	Sol nut. (B0)	Agua (B1)	B2	B3
No de estomas				
NaCl	81 ^a	83 ^a	62 ^a	57 ^b
Cu^{2+}	82 ^a	84 ^a	53 ^a	52 ^b
Fe^{2+}	83 ^a	85 ^a	60 ^a	75 ^a
Asimilación de CO_2				
NaCl	24 ^a	14.6 ^a	31.6 ^a	37.2 ^a
Cu^{2+}	25 ^a	14.6 ^a	28.5 ^a	31.3 ^a
Fe^{2+}	26 ^a	14.6 ^a	35 ^a	24.1 ^a

Diferentes letras en indican diferencias significativas (DMS $P > 0.05$)

B2 = NaCl 50.0, Cu^{2+} 3.0, Fe^{2+} 2.0 mM; B3 = NaCl 100.0, Cu^{2+} 6.0, Fe 5.0

Las variables apertura estomática y absorción de CO₂ no muestran diferencias estadísticas entre elementos del factor A pero si entre ambientes del factor B. El número de estomas en las plantas bajo ambientes de estrés moderados (B2) e intermedio (B3) fue 28% menos que las plantas sin inducción de estrés. Los resultados se presentan en la fig. 9 A y B



B2 = NaCl 50.0, Cu²⁺ 3.0, Fe²⁺ 2.0 mM; B3 = NaCl 100.0, Cu²⁺ 6.0, Fe 5.0

Diferentes letras indican diferencias significativas (DMS P> 0.05)

Figura 9. Promedio de número de estomas y asimilación de CO₂ por efecto de elementos estresantes (A) y ambientes de inducción (B) en *Lippia graveolens* H.B.K.

7.7 Análisis de correlaciones entre variables evaluadas

En la relación entre ambientes inductores de estrés y las variables de biomasa de peso fresco, seco y número de hojas se observan coeficientes de correlación negativos en con valores de $r = -0.93$, -0.88 y -0.79 respectivamente, figura 10 A y B.

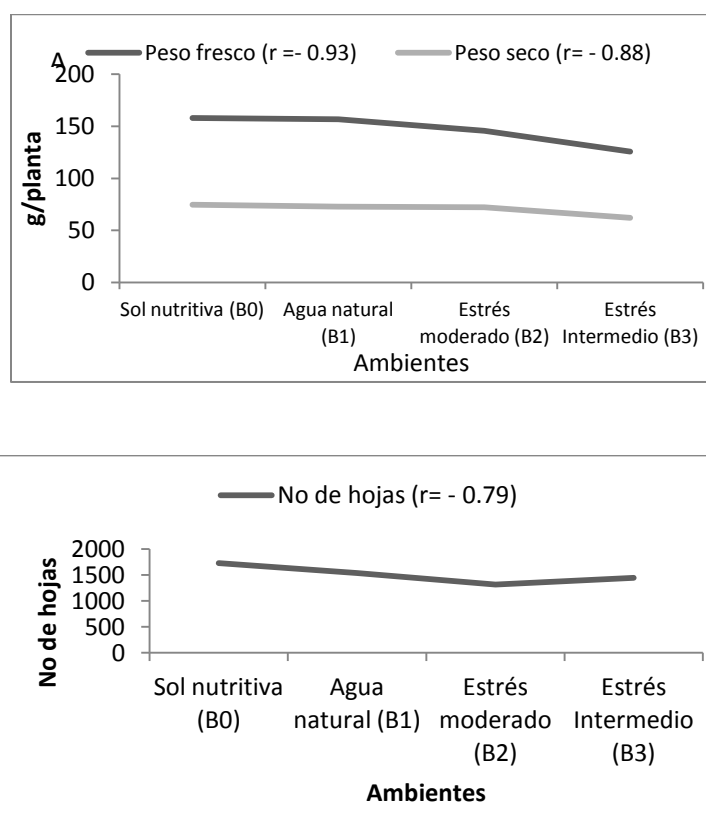


Figura 10. Relación entre ambientes inducidos y variables de peso fresco y seco (A) y número de hojas (B) en *Lippia graveolens* H.B.K.

La producción de aceite esencial se vio influenciada positivamente por el efecto de los ambientes evaluados al mostrar un coeficiente de $r = 0.88$ Figura 11A

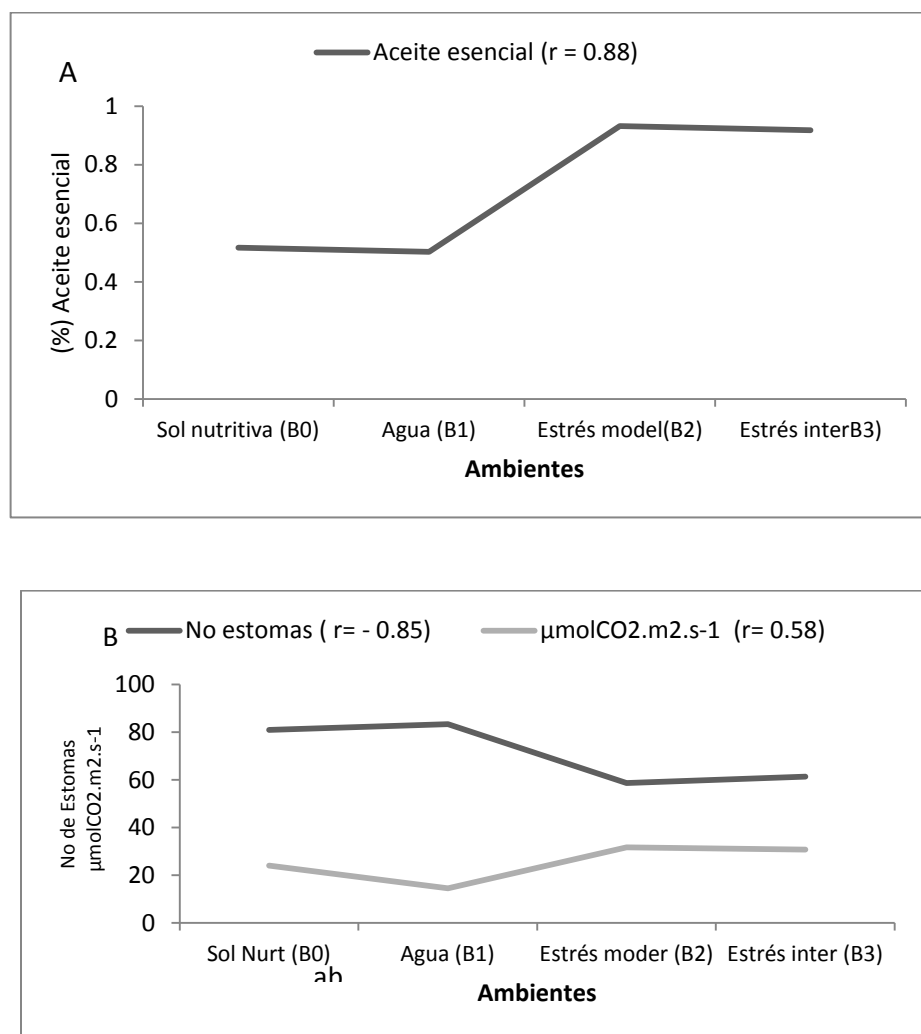


Figura 11. Relación entre ambientes inducidos y variables de aceite esencial (A), número de estomas y asimilación de CO_2 (B) en *Lippia graveolens* H.B.K.

La relación entre numero de estomas y ambientes evaluados mostraron un valor negativo de $r = -0.85$, contrastante con la relación entre condiciones ambientales y asimilación de CO_2 con un valor positivo de $r = 0.58$ figura 11B

La relación de aceite esencial con la asimilación de CO_2 fue positiva al presentar un coeficiente de correlación de $r = 0.89$ y negativa con el número de estomas con un valor de $r = -1.00$ figura 12

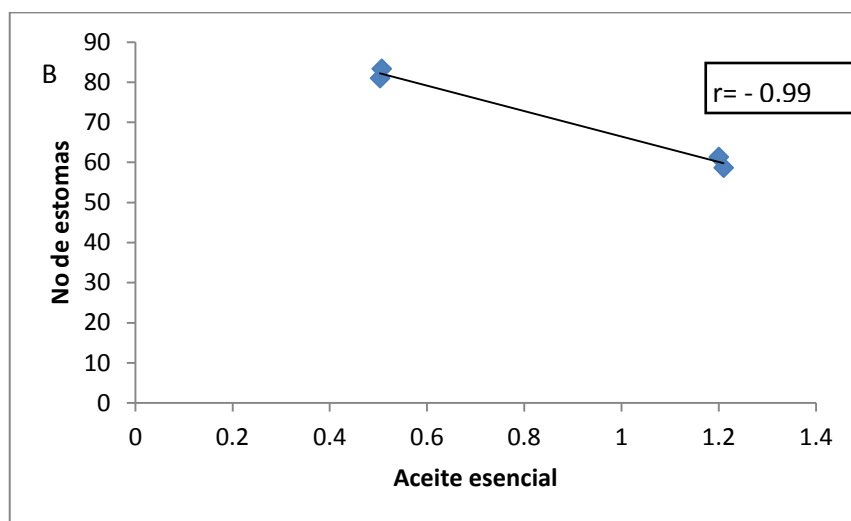
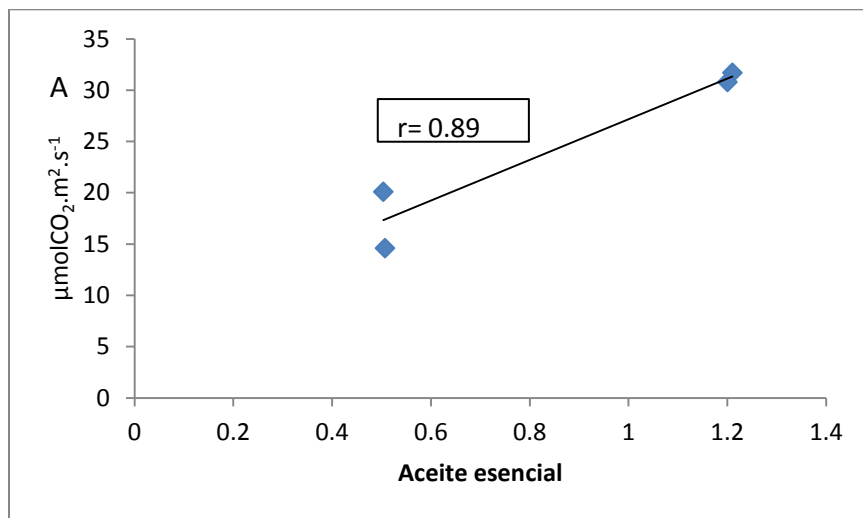


Figura 12. Relación entre variables de aceite esencial con asimilación de CO₂ (A) y número de estomas y (B) en *Lippia graveolens* H.B.K.

La relación entre timol y carvacrol también resultó negativa ($r = - 0.86$) de igual manera CO₂ y número de estomas manifestaron efectos contrastantes con un coeficiente $r = - 0.91$ (Figura 13)

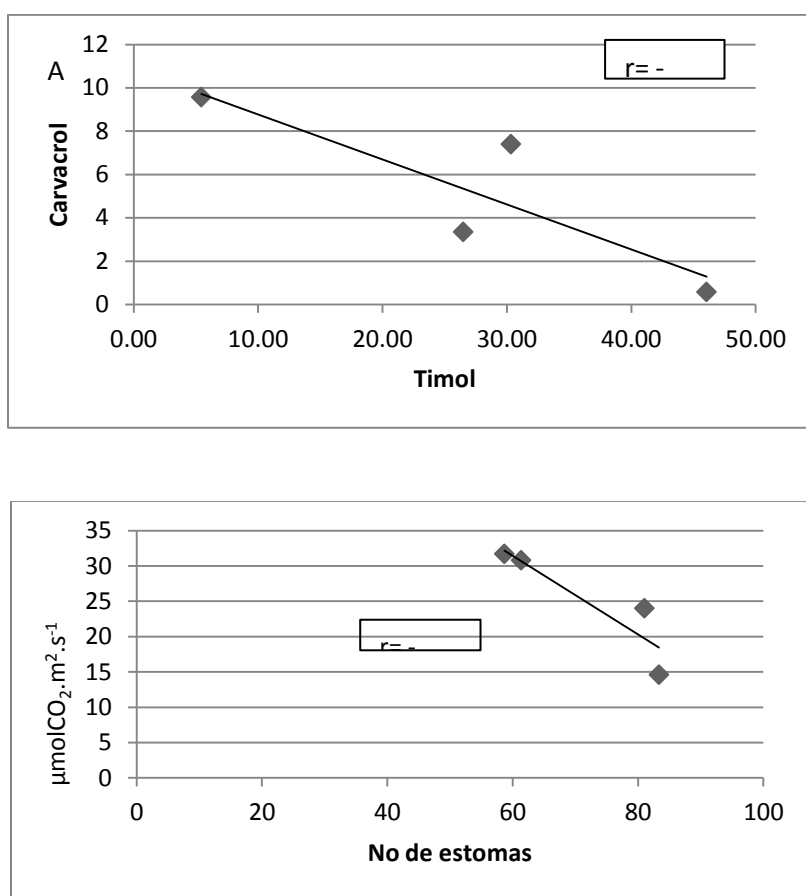


Figura 13. Relación entre variables de timol y carvacrol con CO₂ (A) y número de estomas y (B) en *Lippia graveolens* H.B.K.

Adicionalmente, el análisis detectó una relación positiva entre número de estomas y las variables peso fresco, área foliar y número de hojas con coeficientes de correlación positivos de $r = 0.85$, 0.83 y 0.75 respectivamente.

8. DISCUSIÓN

La inducción de estrés en los ambientes salinos con NaCl afectó negativamente la producción de biomasa en variables de peso fresco y número de hojas, sin embargo, las demás variables no mostraron efectos significativos entre los ambientes evaluados, resultados similares reportaron Psarras et al., (2008), Da Silva et al., (2008) e indicaron como causa, al alto potencial osmótico invertido por las plantas por efecto de estrés en condiciones de salinidad en rangos de 35 a 100.0 mM de NaCl. El efecto inhibitorio en el crecimiento vegetativo ha sido reportado en *Origanum vulgare* por Said-Al Ahl and Hussein, (2010) que reportan reducción en crecimiento vegetativo por efecto NaCl. Los resultados obtenidos por efecto de la aplicación de ambientes estresantes a base de Fe^{2+} y Cu^{2+} no tuvieron efectos negativos significativos en la producción de biomasa. Estos resultaron diferentes a los reportados por Xing et al., (2010) donde señalan, reducción en brotes, raíz y hojas por efecto de exceso Cu^{2+} y Fe^{2+} en la especie *Spirodela polyrrhiza* (L.) Khurana et al.,(2006); Martins and Mourato, (2006) que encontraron reducción de biomasa por exceso de cobre en concentraciones de 0.015 hasta 0.35 mM y de 0.15 a 200 μmol en plántulas de *Licopersicum esculentum* y *Brassica napus* respectivamente sin embargo, Kirbag and Kirbag, (2007), señalan que los niveles de cobre por encima de los requerimientos de las plántulas no surtieron efectos negativos en plántulas girasol (*Helianthus annuus* L.) contrario a este reporte, Panou-Filotheou et al., (2001) que encontraron en *Origanum vulgare*, reducción en altura de planta, raíz y superficie laminar por efecto de exceso de cobre.

La producción de aceite esencial fue superior en las plantas bajo ambientes estresantes en intensidad moderada e intermedia, esto coincide con Singh-Sangwan et al., (1994) al reportar que cantidad de aceite esencial se mantiene o aumenta por efecto de estrés como respuestas metabólicas de las plantas. La relación encontrada entre las condiciones de estrés y el aumento en contenido de aceite en las plantas, podría ser atribuida a la disminución de la biosíntesis de metabolitos primarios por efectos del estrés y en consecuencia causar un aumento en la producción de metabolitos secundarios (Naghdi - Badi et al., 2004). Con relación a la mayor producción de aceite esencial en los ambientes bajo inducción de estrés con los elementos Cu^{2+} y Fe^{2+} coincide con Said and Mhamoud, (2010) al encontrar mayor acumulación de aceite esencial con aplicación foliar de hierro en *Ocimum basilicum*, en este mismo sentido Azis et al., (2010) reportaron que con aplicación foliar de hierro y zinc se logró un incremento significativos de aceite en *Cymbopogon citratus* L. El exceso de cobre y fierro causa estrés oxidativo y en consecuencia una respuesta antioxidante debido al incremento de radicales libre, esto incluye mayor actividad de enzimas antioxidantes (De Vos and Schat, 1992). El efecto de estrés salino inducido en moderada intensidad causó un incremento significativo de aceite en comparación con las condiciones sin inducción de estrés. En *Ocimum basilicum* L. se han reportado cantidades altas de aceite esencial en plantas desarrolladas bajo condiciones de salinidad moderada (Said-Al Ahl and Mahomoud, 2010; Azis et al., 2008; El-Hendaway et al., 2005), sin embargo, otros reportes Said-Al Ahl and Mahomoud, (2010) reportan un descenso en la síntesis de aceite por efecto de salinidad en *Origanum vulgare* L. También, Khorasaninejad

et al., (2010) evaluaron la inducción de estrés salino, *Mentha piperita* L reportaron bajas producciones de aceite por efecto de salinidad.

Los resultados mostraron que los constituyentes del aceite esencial, el quimiotipo timol fue dominante sobre el carvacrol, observándose que dentro del mismo ambiente de manejo y con la misma concentración mostró cantidades contrastantes, similar a lo reportado por Arcila et al., (2004) quien señaló que un incremento en el porcentaje de timol provoca un decremento de carvacrol y viceversa. Aun cuando los valores mas altos de timol y carvacol se observaron en las condiciones de ambiente con inducción de estrés moderado en Cu^{2+} y Fe^{2+} respectivamente, sin embargo, los valores promedio de los ambientes evaluados sin inducción de estrés, fueron significativamente mayores, tal como lo reportó Gurudatt et al., (2010) al señalar que la expresión de genes en diferentes estados de desarrollo es influenciada por el medio ambiente. Lo observado en los resultados en el ambiente salino, coincide con lo reportado por Said-Al Ahl and Mahomoud, (2010) al señalar un decremento de estos metabolitos por efecto de salinidad en *Origanum vulgare* L.

La prolina en follaje y raíz se acumuló en mayor medida por efecto de estrés con Fe^{2+} , en cambio en los promedios del factor B, los mayores valores de prolina se observaron en las condición del ambiente con solo agua, lo que revela que *Lippia graveolens* puede comportarse como una planta hiperacumuladora de prolina tal como lo reporta Kavi- Kishor et al., (2005). En la raíz de las plantas, en ambientes estresantes la prolina acumulo cantidades significativamente mayores, observándose, que las plantas

expuestas a estas condiciones, exhibieron un desarrollo normal y una producción de metabolitos notable

La variable fisiológica clorofila total, fue mayor en las condiciones de ambiente con suministro de solución nutritiva. El número de estomas expuso menos apertura en las plantas bajo condiciones estresantes de iones y salinidad cobre y hierro en cambio, la asimilación de CO_2 fue mayor en las condiciones de ambientes estresantes comparativamente con las plantas sin inducción de estrés

Los resultados obtenidos en apertura estomática corresponden a los reportados por; Yildirim et al., (2008); Amhed et al., (2009); Psarras, et al., (2008). En cambio estos resultados de asimilación de CO_2 no coinciden con los reportados en investigaciones realizadas con diversas especies vegetales (Levit, 1980; Kluge, et al., 1996; Ben -Amhed et al., 2009; Psarras, et al., 2008; Niya Li, et al., 2008) ya que obtuvieron reducidos valores de fotosíntesis por una baja eficiencia de absorción por las plantas bajo estrés en cualquiera de sus modalidades. Sin embargo, la explicación a este fenómeno ya que según lo reportan algunos investigadores, es una respuesta probable de adaptación de las plantas al estrés, al señalar que la acumulación de solutos compatibles (sacarosa, prolina, y glicinbetaina) contribuye a disminuir el potencial osmótico en la hoja bajo la tensión de NaCl, permitiendo a las plantas recuperar o mantener la elasticidad positiva en la célula de modo que puedan crecer bajo la tensión de sal (Heuer, 2005). La respuesta principal es la de reducir la apertura de estomas con el fin de reducir pérdida de agua por transpiración maximizando la absorción de CO_2 esto establece una relación constante entre la transpiración y la

fotosíntesis (Golombek et al., 1993) Ante las condiciones adversas esto causa una adaptación que incluye cambios en la acumulación de biomasa, cambios anatómicos específicos y modificaciones fisiológicas mas complejas además, la aclimatación no nada más es considerada como una respuesta intermedia sino que implica el ajuste osmótico, cambios en la elasticidad de la pared celular y cambios morfológicos. Esto significa que la planta como mecanismo de adaptación al estrés oxidativo probablemente causa una reducción de la apertura estomática, acumulación de solutos compatibles (la sacarosa, prolina, y glicinebetaina) con propósitos de disminuir el potencial osmótico, un incremento de la demanda de CO₂ conjugado con un aumento de la actividad enzimática antioxidante, da como resultado una propagación de productos derivados del metabolismo intermedio como aceite esencial y sus principales componentes timol y carvacrol. Las plantas halofitas pueden crecer bajo condiciones de salinidad debido a su gran capacidad de mantener una alta concentración de sal dentro de sus células (Flowers et al., 1977)

9. CONCLUSIONES

Las condiciones de inducción por salinidad con NaCl y iones Cobre (Cu^{2+}) y hierro (Fe^{2+}) modificaron la producción de biomasa, biosíntesis de aceites esenciales, carvacrol y timol así como la fisiología de las plantas de (*Lippia graveolens*. H.B.K).

Las plantas bajo ambientes estresantes con NaCl produjeron entre 20 y 30 g/planta menos peso fresco y entre 36 y 43% menos hojas, que las plantas sin inducción de estrés, el efecto de los elementos dentro de los ambientes estresantes, Cu^{2+} fue el mejor tratamiento logrando un peso en fresco de 30 y 40 g de planta y entre 200 y 780 hojas más que Fe^{2+} y NaCl, pero similares rendimientos a los obtenidos en los ambientes sin estrés.

La biosíntesis de aceite esencial fue mayor en las plantas bajo ambientes de estrés en intensidad moderada e intermedia comparativamente con las plantas sin estrés. El ion Fe^{2+} en las dos concentraciones aumentó la biosíntesis de aceite esencial en más de un 100% comparativamente con las condiciones sin estrés.

El contenido de timol fue dominante sobre carvacrol en una relación de 5:1, el mayor porcentaje de timol se obtuvo bajo condiciones de estrés con ion Cu^{2+} en el ambiente de estrés moderado con 63%. La cantidad de carvacrol fue de 25%, en condiciones de estrés con ion Fe^{2+} . El tratamiento de agua natural también produjo un alto contenido de timol con 46 %

La prolina fue fluctuante en el follaje y en la raíz, se acumuló indistintamente en los ambientes con y sin estrés, pero en la raíz fue mas frecuente en los ambientes estresantes. Fe^{2+} acumuló la más alta cantidad en el ambiente de mayor inducción de estrés con 471 ppm. Las plantas bajo ambiente de agua natural también acumularon cantidades significativas de prolina.

En las variables fisiológicas, la síntesis de clorofila total decreció 52 y 33% bajo las condiciones de agua natural y condiciones de inducción de estrés moderado en intermedio con relación a las planta bajo solución nutritiva.

El número de estomas se redujo significativamente en promedio de 26.5% en los ambientes estresantes comparativamente con los tratamientos sin estrés.

La asimilación de CO_2 fue mayor en 34% en los ambientes bajo estrés con relación a las plantas sin inducción de estrés.

Los coeficientes de correlación entre los ambientes inductores de estrés y las variables de biomasa y número de estomas expusieron valores negativos, en cambio, la producción de aceite esencial expuso una estrecha relación positiva con los ambientes estresantes inducidos.

El efecto inductor del estrés con intensidad moderada e intermedio con sales NaCl y iones Cu^{2+} y Fe^{2+} causó cambios fisiológicos y metabolicos de las plantas de *L. graveolens* lo que promovió una mayor biosíntesis de aceite esencial, timol y carvacrol, esto sin causar daños irreversibles en el desarrollo normal de las plantas.

10. LITERATURA CITADA

Adams RP. 1995. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy; Allured Publishing Corp. Carol Stream, IL.

Ahmed ChB, Rouna BB, Sensoy S, Boukhriss M, y, Abdullah F B. 2009. Saline Water Irrigation Effects on Antioxidant Defense System and Proline Accumulation in Leaves and Roots of Field-Grown Olive Journal Agricultural Food Chemistry 57:11484–11490

Ahmed ChB, Rouna BB, Sensoy S, Boukhriss M, y, Abdullah FB. 2010. Exogenous Proline Effects on Photosynthetic Performance Antioxidant Defense System of Young Olive Tree. Journal Agricultural Food Chemistry 58: 4216–4222.

Ahmed M, Sagalyn RC, Wildman P, Burke WJ. 1979. Topside ionospheric trough morphology: occurrence frequency and diurnal, seasonal, and altitude variations. Journal of Geophysical Research 84 (A2) : 0148-0227.

Alarcón BM. 1993. Método practico para la predicción de rendimiento de hoja seca de orégano. 24p. México

Alia P, Saradhi P. 1997. Proline accumulation under heavy metal stress. Journal. Plant Physiology 138: 554–558.

Aligiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou IB. 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two Origanum species. Journal Agricultural Food Chemistry 49: 4168-4170.

Anjun A, Abdin M Z, Iqbal M. 2005. Ameliorative effects of CaCl₂ on growth , ionic relations, and proline content of senna under salinity stress Journal of plant nutrition 28(1): pp. 101-125.

AOAC. 1990. Oficial Methods of the AOAC. International 15th Ed. Association Official Agicultural Chemists, Arlington, Va., U.S.A.

Arcila Lozano CC, Loarca G, Lecona S, Gonzalez UE. 2004. El orégano propiedades, composición y actividad biológica de sus componentes. Archivos Latinoamericanos de Nutricion. 54 (1): 100-111.

Arizio, O. y Curioni, A, 2003 Documento Productos aromáticos y medicinales. Estudio: Estudios Agroalimentarios. Componente agroalimentario. Instituto

Interamericano de Cooperación Agrícola (IICA)-CEPAL. Sitio Web: <http://www.iica.org.ar>. 131pp.

Asada K. 1992. Ascorbate peroxidase—a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiology Plant* 85: 235-241.

Ashraf M, Harris PJC. 2004. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants. *Plant Science* 166: 3-12

Avila-Sosa R, Gastélum-Franco MG, Camacho-Dávila A, Torres-Muñoz JV, Nevárez-Moorillón GV. 2010. Extracts of Mexican oregano (*Lippia berlandieri* Schauer) with antioxidant and antimicrobial activity. *Food and Bioprocess Technology* 3: 434-440.

Azirak S, Rencuzogullari, E. 2008. The in vivo genotoxic effects of carvacrol and thymol in rat bone marrow cells. *Environmental Toxicology* 23: 728–735.

Aziz EE., El Din, E AA, Omer EA. 2010. Influence of Zinc and Iron on Plant Growth and Chemical Constituents of *Cymbopogon citratus* L. Grown in Newly Reclaimed Land. *International Journal of Academic Research* 2 (4): 278-283.

Bates L. 1973. Rapid determination of free proline of water stress studies. *Plant Soil* 39: 205- 207.

Baszyński T, Tukendorf A, Ruszkowska M, Skórzyńska E, Maksymiec W. 1988. Characteristics of the photosynthetic apparatus of copper non-tolerant spinach exposed to excess copper. *Journal Plant Physiology* 132: 708-718.

Belaqziz R, Romane A, Abbad A. 2009. Salt Stress Effects on Germination, Growth and Essential Oil Content of an Endemic Thyme Species in Morocco (*Thymus Maroccanus* Ball.). *Journal Applied Sciences Research* 5 (7): 858-863

Benavides MA, Ramirez RH, Robledo TV, Mati R, Cornejo OE, Hernandez DJ, Sandoval RA, Mendoza VR, Samaniego CE, Ramirez MJG, Bacopulos Tellez E, Aguilera CA, Fuentes LLO. 2002. *Ecofisiología y bioquímica del Estrés en Plantas*. Primera ed. Departamento de Horticultura Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Saltillo Coahuila

Bernal GME, Mendonça-Junior CG, Mancini-Filho G. 2003. Estabilidad oxidativa de huevos enriquecidos con ácidos grasos poliinsaturados omega 3, frente a antioxidantes naturales. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 39: 425-432.

Baricevik D, Bartol T. 2002. In: Oregano. The genera *Origanum* and *Lippia*. Medicinal and Aromatic Plants-Industrial Profiles. Edited by Spiridon E. Kintzios, Athens, Greece. Taylor and Francis. London and New York. Chap.8. p 177-213.

Bassole HN, Ouattara AS, Nebie R, Ouattara CAT, Kabore ZI, Traore SA. 2003. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. *Phytochemistry*. 62:209-212.

Biemelt S, Keetman U, Albrecht G. 1998. Re-aeration following hypoxia or anoxia leads to activation of the antioxidative defense system in roots of wheat seedlings. *Plant Physiology* 116: 651–658.

Botsoglou NK, Govaris A, Botsoglou EN, Grigoropoulou SH, Papageorgiou G. 2003. Antioxidant Activity of Dietary Oregano Essential Oil and α -Tocopheryl Acetate Supplementation in Long-Term Frozen Stored Turkey Meat. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (10), pp 2930–2936

Blum A. 2005. Drought resistance, water-use efficiency, and yield potential—are they compatible, dissonant, or mutually exclusive? *Australian Journal of Agricultural Research*. 56, 1159–1168.

Burt SA, Reinders RD. 2003. Antibacterial activity of selected plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7. *Letters in Applied Microbiology* 36: 162-167.

Calucci L, Pinzino C, Zandomenighi M, Capocchi A, Ghiringhelli S, Saviozzi F, Tozzi S, Galleschi L. 2003. Effects of g-irradiation on the free radical and antioxidant contents in nine aromatic herbs and spices. *Journal Agricultural Food Chemistry* 51: 927-934.

Castillo GE, Martínez SI. 2007. *Manual de Fitoterapia*. Masson. Elsevier. p.118.

Castillo QD. 1991. Distribución y ecología del orégano en el municipio de General Cepeda, Coahuila, In: Meléndez G., R., S. A. Ortega R. y R. Peña R. (eds.). Estado actual del conocimiento sobre el orégano en México. Unidad Regional de Zonas Áridas, Universidad Autónoma de Chapingo; Bermejillo, Dgo. México. pp. 77-80.

Cavazos DJR. 1991. Características ecológicas y producción de orégano (*Lippia berlandieri* Schauer) en poblaciones naturales», en: Meléndez G., R., S. A. Ortega R. y R. Peña R. (eds.). Estado actual del conocimiento sobre el orégano en México. Unidad Regional de Zonas Áridas, Universidad Autónoma de Chapingo; Bermejillo, Durango, México.

Chadalavada SV, B. Rajendrakumar VB. Reddy. Reddy AR. 1994. Proline-protein interactions: protection of structural and functional integrity of M4 lactate dehydrogenase. *Biochemistry Biophysical Research Communications* 201:957-963.

Chaman MME. 2007. Variaciones en el contenido relativo de agua y la concentración de prolina en *Capsicum annum* L. inducido por NaCl. *Arnaldoa* 14(2):251- 258.

Chartzoulakis K, Loupassaki M, Bertaki M, Androulakis I. 2002. Effects of NaCl salinity on growth, ion content and CO₂ assimilation rate of six olive cultivars. *Science Horticultural* 96: 235–247.

Chen, LM,. Kao CH. 1999. Effect of excess Cu on rice leaves: Evidence for involvement of lipid peroxidation. *Botanical Bulletin of Academia Sinica* 40: 283–287.

Chinnusamy V,. Jagendorf A, Zhu JK. 2005. Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science* 45: 437-448.

Ciscato M, Valcke R, Van Loven K, Clijsters H, Navari-Izzo F. 1997. Effects of in vivo copper treatment on the photosynthetic apparatus of two *Triticum durum* cultivars with different stress sensitivity. *Physiology Plant* 100: 901-908.

Creelman RA, Tierney ML, Mullet JE. 1992. Jasmonic acid/methyl jasmonate accumulate in wounded soybean hypocotyls and modulate wound gene expression. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 89, 4938–4941.

Da Silva EC, De Araújo F, De Melo F, De Azevedo A. (2008). Physiological responses to salt stress in young umbu plants. *Environmental and Experimental Botany* 63:147-157

Davies PJ. 1995. *Plant Hormones: Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*. Kluwer Academic Publisher, the Netherlands. 883p.

De Vos CH R, Schat H 1992. Free radical and heavy metal tolerance. In: Rozema, J., Verkleji, J.A.C. (Eds.), *Ecological Response to Environmental Stress*. Kluwer, Dordrecht, pp. 22–30

Delaney TP, Uknes, S, Vernooij B, Friedrich L, Weymann, K., Negrotto D, Gaffney T, Gut-Rella, M, Kessmann H, Ward E, Ryals, J. 1994. A central role of salicylic acid in plant disease resistance. *Science* 266: 1247-1250.

Deighton N, Gridewell SM, Deans SJ, Groodman BA. 1993 Identification by EPR spectroscopy of Carvacrol and Thymol as the major sources of free radicals in the oxidation of plant essential oils. *Journal Agricultural Food Chemistry* 63: 221-225.

Dragland S, Senoo H, Wake K, Holte K, Blomhoff R. 2003. Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. *American Society Nutrition Science* 133(5): 1286-1290.

El-Hendaway, S E, Hu Y, Yakout GM, Awad AM, Hafiz and S E. chmidhalter, U 2005. Evaluating salt tolerance of wheat genotypes using the multiple parameters. *European Journal Agronomy*. 22: 243-253.

Ehret DL, Plant AL. 1999. Salt Tolerance in Crop Plants. In: *Environmental Stress in Crop Plants*, Dhaliwal, G.S. and R. Arora (Eds.). Commonwealth Publishers, New Delhi, India, pp: 69-120.

Elgayyar M, Draughon F. Golden DA, Mount JR. 2001 Antimicrobial activity of essential oils from plants against selected pathogenic and saprophytic microorganisms. *Journal Food Protection* 64 (7): 1019-1024.

Epstein I. (1983) Oscillating Chemical Reactions, *Scientific American* 248 (3): 96.

Fikriye KZ, Sevdera K, 2007. Effects of copper on chlorophyll, proline, protein and abscisic acid level of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings. *Journal of Environmental Biology* 28(3) 561-566.

Fonnegra GR, Jiménez RSL. 2007. Plantas medicinales aprobadas en Colombia. Universidad de Antioquia, 2007. p. 368

Flowers TJ, Troke PF, Yeo AR. 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Annual Review and Plant Physiology* 28:89–121

Foyer CH, Harbinson J. 1994. Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. In CH Foyer, PM Mullineaux, eds, *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL, Fridovich I (1975) Superoxide dismutases. *Annual Review Biochemistry* 44: 343-364 USA 83: 3811-3815 177-182 PP 1-42.

Foyer CH, Harbinson J. 1994 Oxygen metabolism and the regulation of photosynthetic electron transport. In CH Foyer, PM Mullineaux, eds, *Causes of Photooxidative Stress and Amelioration of Defense Systems in Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 1-42

Gantet P, Memelink J. 2002. Transcription factors: tools to engineer the production of pharmacologically active plant metabolites. *Trends in Pharmacological. Sciences* 23(12):563-569.

Gianfagna TJ, Carter CD, Sacalis JN. 1992. Temperature and photoperiod influence trichome density and sesquiterpene content of *Lycopersicon hirsutum* f. *hirsutum*. *Plant Physiology* 100: 1403-1405.

Golombek SD, Luedders P. 1993P. Effects of short-term salinity on leaf gas exchange of the fig (*Ficus carica* L.). *Plant Soil* 148:21–2716.

Guerinot M L, Eide D. 1999. Zeroing in on zinc uptake in yeast and plants. *Current Opinion in Plant Biology* 2:244–249.

Gurudatt PS,. Pruti VS, Shwetab B, Ramesha T, Ravikanth G, Vasudeva R. 2010. Changes in the essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L. during annual growth from Kumaon Himalaya. *Current Science* 98: 8- 25

Halliwell B.1982. The toxic effects of oxygen on plant tissues. In: Oberley LW, ed. *Superoxide dismutase*, Vol. I. Boca Raton, FL: CRC Press, 89–123.

Hare PD, Cress WA. 1997. Metabolic implications of stress-induced proline accumulation in plants. *Plant Growth Regulation* 21:79–102.

Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review, Plant Physiology, Plant Molecular Biology* 51: 463-499.

Hamayun M, Afzal KS, Latif K.A, Khan S K., Hussain J, Eun-Young, S, Sang-Mo, K, Yoon-Ha K, Ajmal KM, In- Jung L.2010. Effect of Salt Stress on Growth Attributes and Endogenous Growth Hormones of Soybean Cultivar Hwangkeumkong. *Pak. Journal Botanical* 42(5): 3103-3112

Hernandez-Hernandez E, Ponce-Alquicira E, Jaramillo-Flores ME, Guerrero-Legarreta I. 2009. Antioxidant effect rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) and oregano (*Origanum vulgare* L.) extracts on TBARS and colour of model raw pork batters. *Meat Science*. 81: 410-417.

Hernández R A. 1991. “Aspectos ecológicos del orégano en el altiplano potosino”, In: Meléndez G., R., S. A. Ortega R. y R. Peña R. (eds.) *Estado actual del conocimiento sobre el orégano en México*. Unidad Regional de Zonas Áridas, Universidad Autónoma Chapingo: Bermejillo, Dgo, México. pp. 67-73

Hernández T, Canales M, Ávila J, Durán A, Caballero J, Romo de Vivar A, Lira R. 2003. Ethnobotany and antibacterial activity of some plants used in traditional medicine of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). *Journal of Ethnopharmacology*. 88:181-188

Hernández T, Canales M, García AM, Durán A, Meráz S, Dávila P, Ávila JG. 2008. Antifungal Activity of the Essential Oils of Two Verbenaceae: *Lantana achyranthifolia* and *Lippia graveolens* of Zapotitlán de las Salinas, Puebla (México). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 7:202 – 206.

Hernández T, Canales M, Ávila JG, García AM, Meraz S, Caballero J, Lira R. 2009. Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lippia graveolens* H.B.K. (Verbenaceae). *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 8: 295-300.

Heuer B. 2005. *Handbook de Photoynthesis: Photosynthetic Carbon Metabolism of Crops under Salt Stress*. Secon Edition Taylor & Francis Group, LLC CAP 40 p 1-14

Huerta C. 2005. Orégano mexicano: oro vegetal. Disponible en:<http://www.maph49.galeon.com/biodiv2/oregano.html>.

Hsiao TC, Young, E, Fereres E, Henderson DW. 1976. Water stress, growth and osmotic adjustment. In: *Philosophical Transactions of the Royal Society London. Series B, Biological Sciences* 273(927) 479-500,

Hughes DF, Jolley VD, Brown JC. 1992. Roles for potassium in response mechanisms of strategy I and strategy II palnts. *Journal Plant Nutrition* 15: 1821-1839.

Ietswaart JH. 1980. *Taxonomic ReVision of the Genus Origanum (Labiatae)*; Leiden University Press: Leiden, The Netherlands.

Iyer S, Caplan A. 1998. Products of proline catabolism can induce osmotically regulated genes in rice. *Plant Physiology*. 116:203–211.

Jacinto SR, Flores HA, Castro FR, Silva VR. 2007. Identificación y selección de genotipos de orégano (*Lippia berlandieri* Schauer) sobresalientes en producción de timol y carvacrol. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*. 6: 25-36.

Kampfenkel K, Montagu MV, Inzé D. 1995. Effect of Iron Fxess on *Nicotiana plumbaginifolia* Plants: Implications to Oxidative Stress. *Plant Physiology* 107: 725 – 725.

Kavi-Kishor PB, Sangam S, Amrutha RN, Sri-Laxmi P, Naidu KR, Rao KRSS, Rao S, Reddy KJ, Theriappan P, Sreenivasulu N. 2005. Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science* 88 (3): 424-438.

Kessmann H, Hofmann C, Maetzke T, Herzog J, Ward E, S Theo, Uknes S, Ryals J. 1994. Induction of Systemic Acquired Disease Resistance in Plants by Chemicals. *Annual Review of Phytopathology* (32): 439 -459.

Khosravinejad F, Heydari R, Farboodnia T. 2008. Antioxidant responses of two barley varieties to saline stress [J]. *Pakistan Journal Biology Science* 11: 905-909.

Khorasaninejad S, Mousav A, Soltanlo H, Hemmati K, Khalighi A. 2010. The Effect of Salinity Stress on Growth Parameters, Essential oil Yield and Constituent of Peppermint (*Mentha piperita* L.) *World Applied Sciences Journal* 11 (11): 1403-1407.

Khosravinejad F, Heydari R, Farboodnia T. 2008. Antioxidant responses of two barley varieties to saline stress. *Research Journal Biological Science* 3: 486- 490

Khurana N, Singh MV, Chatterjee C. 2006. Copper Stress Alters Physiology and Deteriorates Seed Quality of Rapeseed. *Journal of Plant Nutrition*, 29: 93–101.

Kim M, Marshal MR, Cornell JA, Preston III JF, Wei CI. 1995. Antibacterial Activity of Carvacrol, Citral, and Geraniol against *Salmonella typhimurium* in Culture Medium and on Fish Cubes. *Journal of Food Science* 60 (6): 1364–1368.

Kiyosue T, Yoshida Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1996. A nuclear gene encoding mitochondrial proline dehydrogenase, an enzyme involved in proline metabolism, is upregulated by proline but downregulated by dehydration in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 8:1323–1335.

Kokkini S, Karousou R, Dardioti A, Krigas N, Lanaras T. 1997. Autumn essential oils of greek oregano. *Phytochemistry* 44 (5): 883-886.

Kramer PJ. 1983 “Drought Tolerance and Water Efficiency”, en: *Water Relations of Plants*, Nueva York, Academy Press, pp. 390-415

Krupa Z, Quist G, Huner NPA. 1993. The effects of cadmium on photosynthesis of *Phaseolus vulgaris* a fluorescence analysis. *Physiology Plant* (88) 626-630.

Larcher, W. 1995. *Physiological plant ecology. Ecophysiology and stress physiology of functional groups*. Springer- Verlag Berlin Heidelberg, Germany. 506p.

Lecona-Uribe S, Loarca-Piña FG, Arcila-Lozano C, Díaz-Moscoso C, Ocampo R. 2003. Nutraceutical potential of Mexican oregano (*Lippia graveolens* K). IFT Annual Meeting. 14E-28.

Lee SO, Ja GK, Soo K.J, Kyoung HL, Yun KC, Jin-Cheol K. 2007. Antifungal activity of five plant essential oils as fumigant against postharvest and soilborne plant pathogenic fungi. *Plant Pathology Journal* 23:97-102.

Levitt J. 1980. Responses of plants to environmental stress. Vol. 2. Academic Press, London, UK.

Lidon FC, Henriques FS. 1991 Limiting step in photosynthesis of rice plants treated with varying copper levels. *Journal Plant Physiology* 138: 115-11

Liu T, Staden JV. 2001. Growth rate, water relations and ion accumulation of soybean callus lines differing in salinity tolerance under salinity stress and its subsequent relief. *Plant Growth Regulation* 34: 277-285.

Madsen HL, Rud Nielsen B, Bertelsen G, Skibsted LH. 1996. Screening of antioxidative activity of spices. A comparison between assays based on ESR spin trapping and electrochemical measurement of oxygen consumption. *Food Chemistry* 57 (2): 331-337.

Mangel, K, Kirkby EA. 2001. Principles of plant nutrition Principles of Plant Nutrition. 5th ed. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. (hardback 849 pp).

McGimpsey J. 1993. Oregano *Origanum vulgare*. Crop & Food research.. <http://www.crop.cri.nz/psp/broadshe/oregano.htm>

McLafferty FW. 1989. Wiley Registry of Mass Spectral Data, 5a ed.; Wiley: New York.

Maksymiec W, Baszynski, T. 1996. Different susceptibility of runner bean plants to excess copper as a function of the growth system of primary leaves. *J. Plant Physiology* 149: 217–221.

Marschner H. 1995. Mineral nutrition of higher plants. Academic Press, London, pp. 344-346.

Martinez- Rocha A, Puga R., Hernandez SL, Piña L., MendozaS. 2008. Antioxidant and antimutagenic Activities of Mexican Oregano (*Lippia graveolens* Kunth). *Plant Foods for Human Nutrition* 63:1–5.

Martínez-Tomé M, Jiménez AM, Ruggieri S, Frega N, Strabbioli R, Murcia MA. 2001. Antioxidant properties of Mediterranean spices compared with common food additives. *Journal of Food Protection* 64 (9): 1412-1419.

Martinez-Velazquez, M, Rosario-Cruz R., Castillo-Herrera G, Flores-Fernandez J. M, Alvarez AH, Lugo-Cervantes E. 2011. Acaricidal Effect of Essential Oils from *Lippia graveolens* (Lamiales: Verbenaceae), *Rosmarinus officinalis* (Lamiales: Lamiaceae), and *Allium sativum* (Liliales: Liliaceae) Against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae) *Journal of Medical Entomology* 48(4):822-827.

Martins, LL, Mourato P. 2006. Effect of Excess Copper on Tomato Plants: Growth Parameters, Enzyme Activities, Chlorophyll, and Mineral Content *Journal of Plant Nutrition*, 29: 2179–2198.

Milos M, Mastelic J, Jerkovic I. 2000. Chemical composition and antioxidant effect of glycosidically bound volatile compounds from oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum*). *Food Chemistry* 71: 79-83.

Menéndez M, Pistone Castró SC. 2009. Manual de Procedimientos Analíticos Para Muestras Ambientales 7004 UY: Determinación de Clorofila a, b y c1 + c2 y Feopigmentos de Clorofila a (feofitina) encontrados en fitoplancton agua dulce y marina. Método Espectrofotométrico de extracción con acetona. Departamento de Laboratorio Ambiental. DINAMA, Ministerio de Ordenamiento Territorial y Medio Ambiente P 9

Mocquot B J, Vangronsveld H, Clijsters Mench M. 1996. Copper toxicity in young maize (*Zea mays* L.) plants: effect on growth, mineral and chlorophyll contents and enzyme activities. *Plant and Soil* 182: 287–300.

Moog PR, Vander Kooij TA, Brüggemann W, Schiefelbein JW, Kuiper PJ. 1995. Responses to iron deficiency in *Arabidopsis thaliana*: the Turbo iron reductase does not depend on the formation of root hairs and transfer cells. *Planta* 195:4 505-13.

Monni S, Uhling C, Hans E, Magel E. 2001. Ecophysiological responses of *Empetrum nigrum* to heavy metal pollution. *Environmental Pollution* 112: 121-129.

Munns, R., Tester M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review Plant Biology* 59: 651–681.

Naghdi Badi, Yazdani H, Mohammad DAS., Nazari F. 2004.. Effects of spacing and harvesting on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. Industrial. Crop Production 19:231–236.

Nawrot T, Plusquin M, Hogervorst J, Roels HA, Celis H, Thijs L, Vangronsveld J, Van Henke E, Staessen JA. 2006. Environmental exposure to cadmium and risk of cancer: a prospective population-based study. *Lancet Oncology*. 7: 119-126

Niya L, Shaoliang Ch, Xiaoyang Z, Chunyan L, Jie S, Ruigang W, Eberhard F, Aloys H, Andrea P. 2008. Effect of NaCl on photosynthesis, salt accumulation and ion compartmentation in two mangrove species, *Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorrhiza* *Aquatic Botany* 88: 313-310.

Ocampo-Velázquez RV, Malda-Barrera GX, Suárez-Ramos G. 2009. Biología reproductiva del orégano Mexicano (*Lippia graveolens* Kunth) en tres condiciones de aprovechamiento. *Agrociencia*. 43: 475-482.

Olivares, SE. 1989. Paquete de diseños experimentales FAUNL. Versión 1.4. Facultad de agronomía UANL. Marín, N.L. México. Autonomía de Nuevo León Facultad de Ciencias Biológicas. San Nicolás de los Garza, N.L., México. 77 P

Olsen RA, Clark RB, Bennet JH. 1981. The enhanced of soil fertility by plant roots. *American Science* 69: 545- 551

Paleg .GG, Steward R, Bradbeer JW. 1984. Proline and glycine betaine influence protein solvation. *Plant Physiology* 75: 974–978.

Pamplona RJD. 2006. Salud por las plantas medicinales. Editorial Safeliz SL.

Parker G, Garcia M, Fukushima Y, Yu W. 1987. Experiments on turbidity currents over an erodible bed. *Journal of Hydraulic. Research* 25: 123-147.

Paredes AMC, Gastélum FMG, Silva VR. 2007. Efecto antimicrobiano del orégano mexicano (*Lippia berlandieri* Schauer) y de su aceite esencial sobre cinco especies del género *Vibrio*. *Revista Fitotecnia Mexicana*. 30:261-267.

Pätsikkä E, Aro EM, Tyystjärvi E, 1998. Increase in the quantum yield of photoinhibition contributes to copper toxicity in vivo. *Plant Physiology* 117: 619-627.

Peng Z, L Q, Verma DPS. 1996. Reciprocal regulation of Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthetase and proline dehydrogenase genes controls proline levels during and after osmotic stress in plants. *Molecular Gen Genetics* 253:334–341

Pierce A. 1999. Practical guide to natural medicines. The American Pharmaceutical Association. A Stonesong Press Book. William Morrow and Company, Inc. New York.; p 728.

Portillo-Ruiz MC, Viramontes-Ramos S, Muñoz-Castellenos LN, Gastélum-Franco M G, Nevárez-Moorillón GV. 2005. Antifungal activity of mexican oregano (*Lippia berlandieri* Shauer). Journal of Food Protection. 12:2713-2717.

Poustini K. Siosemardeh A. 2004. Ion distribution in wheat cultivars in response to salinity stress. Field Crops Research 85: 125-133.

Prasad MNV, Strzalka K. 1999. Impact of heavy metals on photosynthesis. In: Pugnaire FI, Serrano Endolz L, Pardos J. 1994. Constraints by stress on Plant Growth. In: Pessarakli, M. (ed), pp. 247-259. University of Arizona, Tucson, Arizona, USA.

Psarras G, Bertak M, Chartzoulakis K. 2008. Response of greenhouse tomato to salt stress and K⁺ supplement. Plant Biosystems. 142: 149-153.

Quartacci MF, Pinzino C, Sgherri CLM, Dalla Vecchia F, Navari-Izzo F. 2000. Growth in excess copper induces changes in the lipid composition and fluidity of PSII-enriched membranes in wheat. Physiology Plant 108: 87-93.

Raven JA, Evans MCW, Korb RE. 1999. The role of trace metals in photosynthetic electron transport in O₂-evolving organisms. Photosynthesis Research 60: 111-150

Richardson MD, Hovel CS, Bacon CW. 1993. Photosynthesis and stomatal conductance of symbiotic and nonsymbiotic tall fescue. In (Madison, WI, ETATS-UNIS: Crop Science Society of America).

Rodríguez DA, Sanabria ME. 2005. Efecto del extracto de tres plantas silvestres sobre la rizoctoniasis, la mancha sureña del maíz y los patógenos que las causan. Interciencia. 30:739-734.

Royal Botanic Gardens [Página Web en Internet] Richmond (RU): REW; 2009. [Consultada el 14 de agosto, 2010]. Disponible en: <http://apps.kew.org/herbcat/detailsQuery.do?>

Russo M, Galletti GC, Bocchini P, Carnacini A. 1998. Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. 1. Inflorescences. Journal Agricultural Food Chemistry 46: 3741-3746.

Said-Al Ahl, HAH, Omer EA. 2009. Effect of spraying with zinc and / or iron on growth and chemical composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) harvested at three stages of development. *J. Medicinal Food Plants* 1: 30-46.

Said-Al Ahl, HAH, Mhamoud AA. 2010. Effect of zinc and / or iron foliar application on growth and essential oil of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) under salt stress. *Ozean Journal of Applied Sciences* 3(1): 97-110.

Said-Al Ahl, HAH, Hussein MS. 2010. Effect of water stress and potassium humate on the productivity of oregano plant using saline and fresh water irrigation *Ozean Journal of Applied Sciences* 3: 125- 141.

Said-Al Ahl, HAH, Meawad, AA, Abou-Zeid EN, Ali, MS. 2010. Response of different basil varieties to soil salinity. *Journal International Agrophysics* 24: 183-188.

Sagdic O, Kuscu A, Ozcan M, Ozcelik S. 2002. Effects of Turkish spice extracts at various concentrations on the growth of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiological* 19 (5): 473-480.

Salgueiro LR, Cavaleiro C, Gonçalves MJ, Cunha AP. 2003. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Lippia graveolens* from Guatemala. *Planta Medica* 69:80- 3.

Schutzendubel A, Polle A. 2002. Plant responses to abiotic stresses heavy metal-induced oxidative stress and production by mycorrhization. *Journal Experimental Bottany* 53: 1351-1365.

Senarathna T, Merritt D, Dixon K, Bunn E, Tuncel D, Sivashanmugam K. 2003. Benzoyl cinnamate as the functional group in salicylic acid and derivatives in the induction of multiple stress tolerance in plants. *Plant Growth Regulation* 39: 77-81.

Shafi T M, Agnihotri RK. 2010. Chlorophyll and Proline Content of Gram (*Cicer arietinum* L.) under Cadmium and Mercury Treatments. *Research Journal of Agricultural Sciences* 1(2): 119-122.

Silva VR, Dunford NT, 2005. Bioactive components of Mexican Oregano oil as affected by moisture and plant growth. *Journal of Essential Oil Research* 17: 668-671.

Simándi B, Oszagyan M, Lemberkovics É, Kéry Á, Kaszacs J, Thyron F, Mátyás T. 1998. Supercritical carbon dioxide extraction and fractionation of oregano oleoresin. *Food Research International* 31 (10): 723-728.

- Singh V, Bhatt I, Aggarwal A, Trpathi BN, Munjal AK, Shamma V. 2010 Proline improves copper tolerance in chickpea (*Cicer arietinum*). *Protoplasma* 245 (1-4):73-81.
- Singh-Sangwan, N., Farooqif AHA, Singh- Sangawan R. 1994. Effect of drought stress on growth and essential oil metabolism in lemongrasses. *New phitol* 123:173-179.
- Sivropoulou A, Papanikolaou E, Nikolaou C, Kokkini S, Lanaras T, Arsenakis M. 1996. Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oils. *J. Agricultural Food Chemistry* 44: 1202-1205.
- Smirnoff N, Cumbes QJ. 1989. *Phytochemistry* 28: 1057-1060.
- Stohs SJ, Bagchi D. 1995. Oxidative Mechanisms in the Toxicity of Metal Ions *Free Radical Biology. & Medicine* 18(2):321-336.
- Tafur GG, Martínez JR, Stashenko EE. 2005. Evaluación de la actividad antioxidante de aceites esenciales en emulsiones degradadas por radiación ultravioleta. *Revista Colombiana de Química*. 34: 43-55.
- Tappel AL. 1980 in *Free Radicals in Biology* (Pryor, W. A., ed.), vol. 4, pp. 2-47, Academic Press, New York.
- Thomann RJ, Ehrich J, 1993. Bauermann U. Distillation and use of essential oils from dill, celery, lovage and parsley made in Germany. *Acta Horticulturae* 333:101-111.
- Tilman, D. 1988. *Plant Strategies and the Dynamics and Structure of Plant Communities*. Monographs in Population Biology 26. Princeton University Press, Princeton, NJ. 360 pp
- Tripathi BN, Gaur JP. 2004. Relationship between copper- and zinc-induced oxidative stress and proline accumulation in *Scenedesmus* sp. *Planta* 219: 397-40
- Ultee A, Kets EPW, Alberda M, Hoekstra FA, Smid EJ. 2000. Adaptation of food-borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology* 174: 233-238.
- Uribe-Hernández CJ. 1992. The essential oil of *Lippia graveolens* H.B. K. from Jalisco, México. *Journal of Essential Oil Research* 4: 647-649.
- Vanaclocha B, Cañigüeral S. 2006. *Fitoterapia*. Masson. Elsevier. España. p.392.

Van de Mortel JE, Villanueva LA, Shat H, Kwekkeboom J, Coughlan PD, Van Themaat VL, Koornneef M, Aarts MGM. 2006. Large Expression Differences in Genes for Iron and Zinc Homeostasis, Stress Response, and Lignin Biosynthesis Distinguish Roots of *Arabidopsis thaliana* and the Related Metal Hyperaccumulator *Thlaspi caerulescens* L. *Plant Physiology* 142: 1127–1147.

Villavicencio GEE, O. U. Martínez B, Cano A.P. 2007. OREGANO RECURSO CON ALTO POTENCIAL. *Revista Ciencia y Desarrollo*. 3(211): 60-66.

Wasternack C, Hause B. 2002. Jasmonates and octadecanoids: signals in plant stress responses and development. *Progress in Nucleic Acid Research and Molecular Biology* 72, 165-221.

Wasternack C, Parthier B. 1997. Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends in Plant Science* 2: 302-307.

Weckx JEJ, Clijsters HMM 1996. Oxidative damage and defense mechanisms in primary leaves of *Phaseolus vulgaris* as a result of root assimilation of toxic amounts of copper 96: (3) 500-512

Wei X, Savadera- Soto LA, y Arn DJ. 2006. Characterization of the ferrioxamine uptake system of *Nitrosomonas europaea*. *Microbiology* 153: 3963–3972

Witkowski ETF, Lamont BB. 1997. Does the rare *Banksia goodii* have inferior vegetative, reproductive or ecological attributes compared with its widespread cooccurring relative *B. gardneri* *Journal of Biogeography* 24:469–482.

WWW.elergonomista.com 2002. Comunidades de divulgación científico técnica Fisiología Vegetal, consultado el día 1 de Diciembre del 2010

Yancey PH. 2001. Water Stress, Osmolytes and Proteins. *American Zoology* 41:699–709.

Yang R, Kalidas S. 1998. Stimulation of Rosmarinic Acid in Shoot Cultures of Oregano (*Origanum vulgare*) Clonal Line in Response to Proline, Proline Analogue, and Proline Precursors *J. Agric. Food Chem.* 46, 2888-2893

Yeo A. 1998. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole-plant physiology. *Journal Experimental Botany* 49: 915-929.

Yruela I. 2005. Toxic metal in plants Copper in plants. *Braz Journal Plant Physiology* 17: 145-146

Yildirim MA, Goh KI, Cusick ME, Barabási AL, Vidal M. 2007. Drug–target network. *Nat Biotechnol* 25:1119–1126

Yousif AN, Durance TD, Scaman CH, Girard B. 2000. Headspace volatiles and physical characteristics of vacuum-microwave, air, and freeze-dried oregano (*Lippia berlandieri* Schauer). *Food Chemistry and Toxicology* 65: 926-930.

Xing W, Wenming H, Liu G. 2010. Effect of excess iron and copper on physiology of aquatic plant *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleid. *Environmental Toxicology* 25 (2): 103- 112

Xu J, Zhou F, Ji B.P, Pe R.S, Xu N. 2008. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology* 47 (3):174–179.

Zhang FQ, Wan YS, Lou ZP, Dong JD. 2007. Effect of heavy metal stress on antioxidative enzymes and lipid peroxidation in leaves and roots of two mangrove plant seedlings (*Kandelia candel* and *Bruguiera gymnorhiza*). *Chemosphere* 67 (1): 44-50

Zenk MH. 1996. Heavy metal detoxification in higher plants: a review. *Gene* 179:21–30.

Zhu JK. 2003. Regulation of Ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion of Plant Biol.*, 6: 441-445.

Zhu, JK. 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annu. Rev. Plant Biology* 53: 247-273.

11. RESUMEN CURRICULAR

Doctor en ciencias Biológicas con acentuación en Química de Productos Naturales

Tesis: EFECTO DE ESTRÉS INDUCIDO CON NaCl, Cu²⁺ y Fe²⁺ EN BIOMASA, TIMOL, CARVACROL Y PROLINA EN ORÉGANO MEXICANO (*Lippia graveolens* H.B.K)

Campo de estudio: Ciencias Agropecuarias

DATOS PERSONALES:

Nacionalidad: Mexicana

Fecha de Nacimiento: 149 de Noviembre 1953

Puesto Actual: Profesor- Investigador TC “B” Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

ESTUDOS REALIZADOS:

Licenciatura Ing. Agrónomo Fitotecnista.

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Saltillo Coah., México 1977

Maestría en Ciencia Animal

Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro

Saltillo Coah., México 1982

PUBLICACIONES

Valdés Oyervides FJ, C Rivas Morales, A Benavides Mendoza, MA Núñez González, J Verde Star, A Oranday Cárdenas y V Robledo Torres ha sido aceptado para publicación en el Vol 81 (2012) de *PHYTON INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY*.

PARTICIPACION EN CONGRESOS

Valdés Oyervides FJ. Rivas Morales C, Benavides Mendoza A, Núñez González A, Verde Star J, Oranday Cárdenas A. 2009. Efecto de la inducción exógena de estrés metálico y salino en Orégano Mexicano (*Lippia graveolens* H.B.K.) XI Congreso Nacional de Ciencia y Tecnología de Alimentos. 31 de Agosto al 3 de Septiembre y 22 de Mayo San Nicolás de los Garza, N.L., México P 45- 51

Valdés Oyervides FJ. Rivas Morales C., Benavides Mendoza A., Núñez González A, Verde Star J. Oranday Cárdenas A. Biomasa y aceites esenciales en orégano (*Lippia graveolens* H.B.K) por efecto de inducción exógena de estrés. XIII Congreso Nacional de la Sociedad mexicana de Ciencias Hortícolas 17-19 de Agosto 2009. Torreón Coah. México. P 55 -60

Φ Y T O N

INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY

REVISTA INTERNACIONAL DE BOTANICA EXPERIMENTAL

ISSN 0031 9457

Founded 1951 by Fundada en 1951 por
Miguel Mario Raggio & Nora Moro de Raggio

Editor-in-Chief: Dr. Carlos A. Busso

Publicada por/ *Published by:* **FUNDACIÓN RÓMULO RAGGIO**

Director General: Dr. Mario Miguel Raggio

Gaspar Campos 861, 1638 Vicente López (BA) ARGENTINA

TEL: 54-11-4796-1456 / TELFAX: 54-11-4791-0868

www.revistaphyton.fund-romuloraggio.org.ar / fund_r_raggio@hotmail.com

FECHA: 25.02.2012

Francisco J. Valdés Oyervides
Departamento de Horticultura
Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro
Calzada Antonio Narro 1923
Saltillo Coahuila, C.P 25315.
México ollerval12@hotmail.com
De nuestra mayor consideración:

Tenemos el agrado de informarle que el manuscrito “Efecto de inducción de ambientes estresantes con sales y iones en la productividad y acumulación de prolina en *Lippia gaveolens* H.B.K.”

por los autores: **Valdés Oyervides FJ, C Rivas Morales, A Benavides Mendoza, MA Núñez González, J Verde Star, A Oranday Cárdenas y V Robledo Torres** ha sido aceptado para publicación en el Vol 81 (2012) de ΦYTON INTERNATIONAL JOURNAL OF EXPERIMENTAL BOTANY.

Saludamos a Ud. muy atentamente, Alejandra Krüsemann de Raggio Por los Editores de ΦYTON

Efecto de inducción de ambientes estresantes con sales y iones en la productividad y acumulación de prolina en *Lippia graveolens* H.B.K.

F. J. Valdés Oyervides¹, C. Rivas Morales², A. Benavides Mendoza¹, M. A. Núñez González², J. Verde Star², A. Oranday Cárdenas² y V. Robledo Torres²

¹Departamento de Horticultura, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro 1923 Tel / fax (844) 411-03-00 Saltillo Coahuila, México. C.P 25315. ²Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Autónoma de Nuevo León. Cd Universitaria, San Nicolás de los Garza N.L. México. CP. 66450.

Título cortó: Productividad de *Lippia graveolens* H.B.K. en ambientes de estrés inducidos con salinidad y iones

email ollerval12@hotmail.com

Resumen. Bajo invernadero fueron investigados cuatro condiciones de manejo para evaluar los efectos de inducción de estrés sobre producción de biomasa, aceite esencial, timol, carvacrol y acumulación de prolina en *Lippia graveolens* H.B.K. En un diseño bifactorial con anidamiento de soluciones en los elementos estresantes, salino (NaCl) y iónico (Cu^{2+}) y (Fe^{2+}) como (factor A), en cada uno de ellos se evaluaron cuatro condiciones o ambientes (Factor B): Solución nutritiva comercial (B0); Agua (B1); en dos concentraciones o intensidades inductoras con los elementos propuestos de estrés moderada (B2) e intermedia (B3). Los resultados de producción de peso fresco, y número de hojas fue más baja en (NaCl) de igual manera en ambientes de inducción de estrés en ambas intensidades, sin embargo, en el promedio de los cuatro ambientes no se observaron diferencias significativas. La cantidad de aceite esencial fue significativamente mayor en el ambiente de estrés con Fe^{2+} y Cu^{2+} en ambas concentraciones. Los porcentajes promedio de timol y carvacrol fueron superiores en los elementos (Cu^{2+}) y (Fe^{2+}) en los ambientes de inducción de estrés en intensidad moderada se observaron los valores más altos para timol y carvacrol. La acumulación de prolina, se observó en mayor cantidad en la raíz que en el follaje, las condiciones estresantes de los elementos en ambas intensidades expusieron valores superiores, sin embargo los ambientes de no estrés también acumularon altas cantidades. Se mostró una correlación positiva ($r = 0.997$) entre la producción de aceite esencial y prolina acumulada. El estrés inducido con salinidad y iones (Cu^{2+}) y (Fe^{2+}), derivó en mayor acumulación de metabolitos secundarios.

Palabras clave: Orégano, sales, metales, timol, carvacrol, prolina

Abstract. In greenhouse were investigated four dynamic conditions to evaluate the effects of induction of stress on production of biomass, essential oil, Thymol, carvacrol and proline accumulation in *Lippia graveolens* H.B.K. Bifactorial design with concentrations in the stress elements (factor A) saline (NaCl) and ion (Cu^{2+}) and (Fe^{2+}), each of them assessed four conditions or environment (factor B): commercial nutritive solution (B0); Water (B1); in two intensities moderate (B2) and intermediate (B3) stress induction,

with the proposed elements. The results of average production of fresh weight, and number of leaves were more low (NaCl) in the same way in terms of induction of stress in both intensities, however, on the average of the four environments here were no significant differences. The amount of essential oil was significantly higher in stress environments with and Fe^{2+} and Cu^{2+} in the induction of both intensities. The average percentages of Thymol and carvacrol were higher in the elements (Cu^{2+}). (Fe^{2+}) respectively comparatively with NaCl, in the same way, the values were observed in environments of induction of stress at moderate intensity more high Thymol and carvacrol. The accumulation of proline, see more at the root in the foliage, the stress conditions of elements in both intensities presented higher values, however the environments of not stress also accumulated high amounts. It showed a positive correlation ($r = 0.997$) between the production of essential oil and accumulated proline. The stress induced with salinity and ions (Cu^{2+}) and (Fe^{2+}), has led to greater accumulation of secondary metabolites

Keywords: oregano, salt, metals, thymol, carvacrol, proline.

INTRODUCCIÓN

La composición y la cantidad de metabolitos secundarios de las plantas dependen en gran medida de factores ambientales. Cuando son sometidas a condiciones adversas, se genera un efecto que desarrolla una respuesta en procesos fisiológicos, bioquímicos y metabólicos (Benavides et al., 2001); ello indica la posibilidad de manipular su concentración o cantidad relativa a través de técnicas de manejo agronómico. La inducción controlada de estrés a través de compuestos señalizadores o prooxidantes es una conocida herramienta cada vez más utilizada para explorar las respuestas fisiológicas y metabólicas adaptativas de la planta (Kessmann et al., 1994). Por ello se considera factible su aplicación con el propósito de promover y/o incrementar biosíntesis de metabolitos secundarios (Gantet y Memelink, 2002)

Se sabe que la aplicación controlada de algún tipo de estrés ambiental que origina estrés oxidativo celular, o bien la aplicación de un compuesto prooxidante como H_2O_2 , el ácido salicílico o los metales pesados, causan cambios en el metabolismo redox de las plantas los cuales dan lugar, a través de una cascada de señales, a la modificación de expresión genética y a la obtención de fenotipos con una diferente composición química (Benavides et al., 2002). En particular en el caso de iones libres de metales el factor inductor de la respuesta es la acumulación de radicales libres derivados de reacciones Fenton (Stohs y Bagchi (1995). Este mecanismo de toxicidad de los metales en forma iónica fue descrito para el cobre (Mangel y Kirkby (2001) y para el hierro (Xing et al., 2010). En el caso de estrés inducido por la salinidad el fenómeno oxidativo está bien entendido en el caso de la primera fase de acción del estrés por sales, y se manifiesta a través de acumulación de osmolitos en hojas y raíces (Ahmed et al., 2009) así como el control de la apertura estomática (Chartzoulaki et al., 2009), por medio de la acumulación de prolina en hojas y raíces (Munn (2008).

El orégano mexicano (*Lippia graveolens* H.B.K.) tiene un amplio potencial de aprovechamiento en el campo alimenticio y farmacéutico. La composición química del aceite esencial del orégano es de gran importancia por su actividad biológica, ya que tiene compuestos fenólicos de efectividad antimicrobiana, como el timol y el carvacrol que contra efectos contra las bacterias Gram negativa (Arzila-Lozano, et al (2004). Por otro lado estudios preliminares sobre actividad biológica sugirieron que los aceites esenciales del orégano poseen potencial anticancerígeno (Sivropoulou (1996). Existen reportes sobre la variabilidad en el contenido de timol y carvacrol por efecto del medio ambiente, (Russo et al., 1998; Gurudatt et al., 2010)). Por lo tanto. El objetivo de este trabajo fue evaluar en *Lippia graveolens* los efectos de soluciones salinas con NaCl y soluciones iónicas con cobre y hierro, sobre el crecimiento de la planta y la producción de aceites esenciales así como sobre el contenido de timol y carvacrol y sobre la producción de prolina

MATERIALES Y METODOS

Esta investigación se llevó a cabo bajo condiciones de invernadero en las instalaciones de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro en Saltillo, Coahuila, Méx. Cuando las plantas *Lippia graveolens* H.B.K. alcanzaron una altura de 30 cm, se trasplantaron en macetas plásticas con capacidad de 16 L, usando como sustrato una mezcla comercial BERGER peatmoss (80% turba, 10% de Perlita y 10% de vermiculita), para el riego se utilizó agua de sistema de riego natural con un pH de 7.65 y una C.E. de 715 microS/cm. La temperatura promedio que prevaleció en el invernadero fue de 26°C y humedad relativa entre 60 a 70 %. Cuando las plantas alcanzaron tres meses de edad se podaron a una altura de 30cm. Posteriormente se seleccionaron 88 plantas, se distribuyeron en forma balanceada en base a un diseño completamente al azar con arreglo bifactorial con anidamiento de niveles de concentración en elementos estresantes, con el fin de evaluar cuatro condiciones o ambientes en el factor B identificadas como: B0=ambiente óptimo, B1= ambiente natural, B2= ambiente con inducción de estrés moderado y B3= inducción de estrés intermedio) anidadas en tres elementos inductores de estrés, identificadas como factor A (A1= NaCl, A2=Cu²⁺ y A3=Fe²⁺), la concentración evaluada en los ambientes estresantes en niveles moderado e intermedio ubicadas en B2 y B3, se formularon en unidades mM de: (50.0 y 100.0 de NaCl), (3.0 y 6.0 de Cu²⁺) y (2.5 y 5.0 de Fe²⁺) respectivamente, las condiciones medio ambiente óptimo y natural identificadas con B0 y B1 fueron: (solución nutritiva comercial fertiplus y agua natural) respectivamente, los cuales se mantuvieron fijos en cada elemento del factor A

El tratamiento fertiplus tuvo los siguientes porcentajes de elementos nutritivos; N =7.28, K₂O₂ =14.07, Fe= 0.006, Zn= 0.002, S= 1.31, Mo= TRAZA, P₂O₂= 8.21, Mg=0.086; Cu=0.001, Mn= 0.075, B=0.002, Ca=0.19. Para la elaboración de las soluciones estresantes correspondientes se empleó NaCl, peso molecular (PM = 58.4g/mol); CuSO₄ 7H₂O (PM=285.7168 g/mol); y Fe SO₄ 7H₂O (PM=278.0157 g/mol) grado reactivo. Las soluciones se aplicaron según correspondía a cada ambiente, cada semana. Las soluciones de Cu²⁺ y Fe²⁺ se aplicaron con una bomba de aspersión manual a punto de goteo. La solución de NaCl y la solución nutritiva fueron aplicadas directamente al sustrato con una regadera tipo jardín en un volumen de 1.5 L/planta.

Las variables evaluadas fueron:

Biomasa: para Peso fresco y seco, se tomaron ocho plantas de cada tratamiento, a las cuales se les separaron las hojas, los brotes, los tallos y las raíces y se pesaron inmediatamente para obtener el peso fresco, para lo cual se utilizó una balanza analítica digital OHAUS modelo TS120. Posteriormente este material vegetal se secó con aire caliente a 65° C durante 48 horas para obtener el peso seco mediante el uso de una estufa MAPSA modelo HDP334. Para determinar área foliar y número de hojas se usaron tres plantas por tratamiento, las cuales se defoliaron y se contabilizó sus hojas y el área foliar se determinó con un medidor de área foliar portátil, marca LI-corr. Modelo LI-3000A.

Aceites esenciales. El contenido fue determinado en las 3 plantas utilizadas para área foliar, el material fue triturado con un Molino THOMSON modelo 3383-L10. Posteriormente se procedió a la extracción de aceite esencial por la técnica de destilación por arrastre de vapor AOAC(1990).

Timol y carvacrol. La identificación de los componentes se llevó a cabo por análisis de cromatografía de gases - Espectrometría de masas (GC / MS) en un HP 6890 acoplado a un HP 5972 MSD (con rango de masa m/z 50-550) y un Agilent DB-5MS de columna capilar de (30 m × 0,25mm) con un espesor de 0,25 µ de película. El gas acarreador usado fue helio. El programa de temperatura inicial fue 60 ° C. min, la temperatura final fue de 280°. Con un gradiente de 9 °C/min

Los índices de retención (IR) para la identificación de los compuestos fue determinada sobre las bases de homólogos n- alcanos hidrocarbonados bajo las mismas condiciones, el reactivo fenchone fue usado como estándar a una concentración de 0.01 mg/mL de diclorometano, la composición fue obtenida por el área normalizada y la respuesta para cada factor fue considerado como 1, los compuestos fueron identificados por

comparación de (IR) y espectro de masas de acuerdo con los datos publicados por Adams (1995) y McLafferty (1989). Con las áreas de cada muestra se obtuvo la concentración en ppm de timol y carvacrol mediante la siguiente fórmula:

$$Y = 2,9693x - 2,6052$$

$$r^2 = 0,9168$$

$$X = (Y + 2,6052) / 2,9693$$

En donde: Y = área o superficie obtenida en el cromatograma y X= concentración en ppm de timol y carvacrol

Prolina. Esta se realizó en follaje y raíz en base al análisis propuesto por (Bates et al., 1973). Medio gramo de hoja o raíz se maceraron en 10 mL en una solución acuosa de ácido sulfosalicílico al 3% peso/volumen y posteriormente se sonicó por 5 minutos y se filtró la solución en un embudo de filtración rápida utilizando papel Whatman No. 2. Una alícuota (2 mL) se colocó en un tubo de ensayo al que se le agregaron 2 mL de ácido ninhidrílico y 2 mL de ácido acético glacial para después colocar el tubo a una temperatura de 100°C durante una hora. Finalmente la reacción se completó en un baño de hielo. Se agregan 4 mL de tolueno y el contenido del tubo se mezcló vigorosamente durante 20 segundos. Posteriormente se aspiró la parte de tolueno con una pipeta, se estabilizó a temperatura ambiente y se determinó la absorbancia ($\lambda = 520$ nm) en un espectrofotómetro SEQUOIA-TURNER-690. Se usó tolueno como blanco para calibrar el aparato. La concentración de prolina se determinó a partir de una curva de calibración y se calculó en base a peso fresco de la siguiente manera:

$$\frac{\text{ppm de prolina de la curva}}{\text{g de material, peso fresco}} \times (\text{volumen de aforación}) = \text{ppm de prolina}$$

Análisis estadístico. A los datos obtenidos se les realizó análisis de varianza en base a un modelo bifactorial anidados de ambientes (factor B) en elemento estresantes (factor A), por medio del paquete estadístico SAS 9.2 (SAS Institute, 2009). Las diferencias estadísticas de medias de los factores por Tukey ($P \leq 0.05$), empleando el paquete estadístico de FAUANL. Ver 1,4 Olivares (1989). Además se realizaron análisis correlaciones entre las variables de aceite esencial y contenido de prolina

RESULTADOS

Biomasa. Los resultados obtenidos de peso fresco y número de hojas mostraron diferencias estadísticas en el promedio del factor A, el estrés inducido con Cu y Fe produjeron 156.1 y 145.7 g/planta y 1640 y 1538 hojas por planta (Tukey $p \leq 0.05$ Tabla 1), mientras que el elemento con NaCl produjo 137.9 g/planta y 1331 hojas, el área foliar y peso en seco no expuso diferencias estadísticas. Los valores promedio en los ambientes estresantes del factor B no tuvieron diferencias significativas en el desarrollo de ninguna variable vegetativa. Las condiciones inducidas en los ambientes de estrés moderado (B2) e intermedio (B3) anidados en el factor A, expuso diferencias significativas, la inducción con 100.0 mM de NaCl en la condición B3 afectó negativamente el peso en fresco al producir el valor más bajo con 110.9 g/planta lo que significó una reducción de alrededor de 40 g/planta comparativamente con los ambientes sin inducción de estrés en B0 y B1, el resultado de número de hojas con inducción de estrés con 50.0 y 100.0 mM que corresponden a los ambientes B2 y B3, causaron un efecto negativo al producir 38.1 y 42.8% menos hojas respectivamente en relación con los ambientes de B0 que identifica a la solución nutritiva.

Tabla 1. Producción de biomasa en diferentes ambientes con elementos de inducción de estrés con NaCl, Cu²⁺, y Fe²⁺

en Orégano Mexicano (*Lippigraveolens* H.B.K..)

bientes (factor B)					
Elemento (factor A)	B0	B1	B2	B3	Prom. factor A
Peso en fresco g/planta					
NaCl	158.1 A a	156.9 Aa	125.9 Aab	110.9Ab	137.9 b
Cu ²⁺	158.1 A a	156.9 Aa	171.0 Aa	138.5Aa	156.1 a
Fe ²⁺	158.1 Aa	156.9 Aa	139.8 Aa	128.12 Aa	145.7 a
Pom/factor B	158.1 A	156.9 A	145.6 A	125.8 A	
Peso en seco g/planta					
NaCl	74.6 A a	72.9 A a	64.5 A a	56.3 A a	67.1 a
Cu ²⁺	74.6 A a	72.9 A a	83.3 A a	66.3 A a	74.2 a
Fe ²⁺	74.6 A a	72.9 A a	68.3 A a	63.3 A a	69.9 a
Pom/factor B	74.6 A	72.9 A	72.0 A	62.1A	
Área foliar cm ²					
NaCl	360 A a	260 A a	179 A a	165 A a	241.0 a
Cu ²⁺	361 A a	261 A a	277 A a	298 A a	299.3 a
Fe ²⁺	362 A a	262A a	252A a	271 A a	286.8 a
Pom/factor B	361 A a	261A a	236A a	245 a	
No de hojas					
NaCl	1720 A a	1537 A ab	1070 B b	988Bb	1331 b
Cu ²⁺	1730 A a	1537 A a	1536 A a	1756 A a	1640 a
Fe ²⁺	1730 A a	1537 A a	1334 ^a a	1548 A a	1538 a
Pom/factor B	1730 A	1537 A	1313 A	1431 A	
Ambientes:					
	B0	B1	B2: intensidad moderada	B3: intensidad intermedia	
Condiciones evaluados	Nutritiva	a	1) NaCl 50.0, Cu 3.0, Fe 2.5.	1) NaCl,100.0, Cu 6.0, Fe 5.0mM	

Diferentes letras mayúsculas entre (factor A) y minúsculas entre (factor B) indican diferencias significativas (Tukey p≤0.05)

Aceite esencial. En los resultados de producción de aceite esencial se encontraron diferencias significativas entre el los factores A y B. Las plantas desarrolladas en el elemento Fe²⁺ acumularon en promedio 43 y 34 % más aceite que las plantas en los elementos de NaCl y Cu²⁺ respectivamente (Tukey p≤0.05 Tabla2). Las condiciones estresantes en el factor B con ambientes de intensidad moderadas (B2) e intermedio (B3) produjeron en promedio 80 y 84 % mas que en los ambientes (B0) sol nutritiva y (B1) agua respectivamente.

El estrés inducido con el elemento Fe^{2+} en concentración de 2.5 y 5.0 mM en B2 y B3 respectivamente, obtuvieron la mayor cantidad de aceite con 1.2 y 1.3 % respectivamente superando por más del doble la producción obtenida en los ambientes sin inducción de estrés, de igual manera pero en menor escala se obtuvieron incrementos significativamente en las mismas condiciones con las concentraciones con Cu^{2+} de 3.0 y 6.0 mM y en 50.0 mM de NaCl, la inducción con 100.0 mM se mantuvo estadísticamente igual pero similar a los ambientes sin estrés

Tabla 2.. Porcentaje de aceite esencial en diferentes ambientes con elementos de inducción de estrés con NaCl, Cu^{2+} , y Fe^{2+} en Orégano Mexicano (*Lippia graveolens* H.B.K.)

*Ambientes (factor B)					
Elemento (factor A)	B0	B1	B2	B3	Prom. Factor A
NaCl	0.5167 A b	0.5033 A b	0.770 B a	0.672 C a b	0.616 B
Cu^{2+}	0.5167 A b	0.5033 A b	0.793 B a	0.816 B a	0.658 B
Fe^{2+}	0.5167 A b	0.5033 A b	1.233 A a	1.267 A a	0.880 A
Prom. Factor B	0.5167 b	0.5033 b	0.9322 a	0.9186 a	

ambientes:	B0	B1	B2: intensidad moderada	B3: intensidad intermedia
condiciones evaluadas	Nutritiva	a	1) NaCl 50.0, Cu 3.0, Fe 2.5.	1) NaCl, 100.0, Cu 6.0, Fe 5.0 mM

Diferentes letras mayúsculas entre (factor A) y minúsculas entre (factor B) indican diferencias significativas (Tukey $p \leq 0.05$)

Timol y carvacrol. El análisis estadístico de los resultados mostró diferencias significativas ($p \leq 0.05$) entre los factores A y B, (Tabla 3), indicando que tanto el factor A como el factor B influyeron sobre el contenido de estos quimiotipos. Al analizar el efecto inductor del factor A sobre la producción de timol se encontró que el elemento Cu^{2+} produjo el mayor promedio con 36.48 % superior estadísticamente ($p \leq 0.05$) al tratamiento con NaCl y Fe^{2+} que promediaron 24.91 y 19.83 % respectivamente. Mientras que en el contenido de carvacrol el tratamiento con Fe^{2+} , también fue estadísticamente superior con un promedio de 8.92 %.

Los valores promedio obtenidos por efecto de los ambientes evaluados el ambiente (B1) con suministro de agua natural, tuvo el mayor contenido de timol (46.47%), superando estadísticamente a los otros tres ambientes bajo estudio, mientras que el valor más alto de carvacrol, se obtuvo en la condición del ambiente B0 con un promedio de 9.57 %.

Tabla 3. Porcentaje de timol y carvacrol en diferentes ambientes con elementos de inducción de estrés con NaCl, Cu^{2+} , y Fe^{2+}

en Orégano Mexicano (*Lippia graveolens* H.B.K.)

		Ambientes (factor B)				m.factorA
mento (factor A)		B0	B1	B2	B3	
iol	Cl	5.43 A c	46.04 A a	25.22 B b	22.95 B b	24.91 b
	+	5.43 A d	46.04 A b	63.05 A a	31.38 A c	36.48 a
	+	5.43 A c	46.04 A a	2.70 C c	25.1367 B b	19.83 c
	m Nivel B	5.433 d	46.047 a	30.32 b	26.49 c	
vacrol	Cl	9.57 A a	0.57 A b	0.25 B b	0.23 B b	2.66 b
	+	9.57 A a	0.57 A b	0.51 B b	0.89 B b	2.92 b
	+	9.57 A b	0.57 A b	21.43 A a	3.92 A c	8.92 a
	m. Factor(B)	9.570 a	0.577 d	7.400 b	3.350 c	

mbientes:	B0	B1	B2: intensidad moderada	B3: intensidad intermedia
ciones evaluados	Nutritiva	a	1) NaCl 50.0, Cu 3.0, Fe 2.5.	1) NaCl,100.0, Cu 6.0, Fe 5.0mM
Diferentes letras mayúsculas entre (factor A) y minúsculas entre (factor B) indican diferencias significativas (Tuyey $p \leq 0.05$)				

La acumulación de timol y carvacrol, en los ambientes estresantes B2 y B3 anidados dentro de los elementos expusieron resultados contrastantes, la inducción con salinidad NaCl con 50 y 100 mM y Fe^{2+} con 2.5 y 5.0 mM produjeron la mitad o menos que el ambiente B1 sin inducción de estrés, en cambio el valores mas alto se logro en el ambiente estresante con 3.0 mM de Cu con 63.05 %. En la producción de carvacrol la aplicación con 2.5 mM de Fe ubicado en B2 produjo el valor mas alto con 21.43% superando estadísticamente a las condiciones ambientales sin inducción de estrés y a la concentración intermedia del mismo elemento ubicada en el ambiente B3.

Prolina

El análisis prolina muestra diferencias significativas en los factores A y B tanto en follaje como en raíz (Tabla 4). En follaje la inducción de elementos estresantes se acumuló con 159.8 ppm con la aplicación del elemento Fe^{2+} , superando estadísticamente a Cu^{2+} y NaCl (Tukey $p \leq 0.05$), en raíz también el elemento estresante Fe^{2+} acumulo la mayor cantidad con 184.16 ppm superando a los otros dos elementos. El promedio de prolina acumulada en el follaje en los ambientes estresantes en intensidad moderado B2 e intermedio B3 fue menor en relación a lo acumulado en el ambiente B1 que corresponde a la condición con agua que acumulo 276 ppm. La acumulación de prolina en raíz también fue mayor en condición ambiental B1 con un valor de 192 ppm, pero, estadísticamente igual al valor promedio obtenido en la condición estresante B3.

El análisis comparativo en el follaje de las condiciones estresantes de B2 y B3 en los elementos inductores de A, el elemento estresante Cu^{2+} en el ambiente (B2) tuvo un efecto significativo pero igual estadísticamente a solución nutritiva en el ambiente B1. En la raíz fue mas frecuente encontrar valores superiores de prolina, el

elemento Cu^{2+} en concentración moderada de 3.0mM y el ambiente salino dentro de la condición ambiental B2 acumulo una cantidad de 213.6 y 176.66 ppm respectivamente, en el ambiente B3 el mayor valor de prolina se lejo con la inducción de 5.0 mM del elemento Fe con un valor de 471 ppm superando a todos las condiciones ambientales elementos bajo estudio.

Tabla 4. Cuadro 1. Prolina acumulada en ppm en diferentes ambientes con elementos de inducción de estrés con NaCl, Cu^{2+} , y Fe^{2+} en Orégano Mexicano (*Lippia graveolens* H.B.K.)

*Ambientes factor B					
Elemento (factor A)					m. factor A
Cl	1.00 A b	5.33 Aa	66 B b	00 B bc	117.5 B
Cu^{2+}	1.00 A b	5.33 Aa	1.00 A a	00 B c	127.2 B
					159.8 A
Fe^{2+}	1.00 A b	5.33 Aa	00 B b	33 A b	
m. factor B	1 b	5 a	5.2 b	6 c	
Cl	66 A b	1.00 A a	5.66 A a	66 C b	107.0 B
Cu^{2+}	66 A b	1.00 A a	5.6 A a	33 B b	135.42 B
Fe^{2+}	66 A c	1.00 A b	00 B c	1.00 A a	184.16 A
m. factor B	7 c	1.0 a	5.1 b	1.0 a	

ambientes:	B0	B1	B2: intensidad moderada	B3: intensidad intermedia
condiciones evaluados	Nutritiva	a	1) NaCl 50.0, Cu 3.0, Fe 2.5.	1) NaCl, 100.0, Cu 6.0, Fe 5.0mM

Diferentes letras mayúsculas entre (factor A) y minúsculas entre (factor B) indican diferencias significativas (Túyey $p \leq 0.05$)

Adicionalmente se detectó una estrecha relación entre la producción de aceite esencial y la cantidad acumulada de prolina con un coeficiente de correlación ($r = 0.997$) y (0.975) para prolina en follaje y raíz respectivamente.

DISCUSIÓN

Biomasa. La inducción de estrés en los ambientes salinos con NaCl afectó negativamente la producción de biomasa en variables de peso fresco y número de hojas, sin embargo, las demás variables no mostraron efectos significativos entre los ambientes evaluados, resultados similares reportaron (Psarras et al., 2008; Da Silva et al., 2008) e indicaron como causa, el alto potencial osmótico invertido por las plantas por efecto de estrés en condiciones de salinidad en rangos de 35 a 100.0 mM de NaCl. El efecto inhibitorio en el crecimiento vegetativo ha sido reportado en *Origanum vulgare* por Said-Al Ahl y Mahomoud, (2010) que reporta reducción en crecimiento vegetativo por efecto NaCl. Los resultados obtenidos por efecto de la aplicación de ambientes estresantes a base de Fe y Cu no tuvieron efecto negativo significativo en la producción de biomasa. Estos resultados fueron diferentes a los reportados por (Xing et al., 2010) donde señalan, reducción en brotes, raíz y hojas por efecto de Cu^{2+} y Fe^{2+} en la especie *Spirodela polyrrhiza* (L.) y (Khurana et al., 2006; Martins y Mourato, 2006) que encontraron reducción de biomasa por exceso de cobre en concentraciones de 0.015 hasta 0.35 mM y de 0.15 a 200 μmol en plántulas de *Lycopersicon esculentum* y *Brassica napus* respectivamente sin embargo, Kirbag y Kirbag (2007) señalan que los niveles de cobre por encima de los requerimientos de las plántulas no surtieron efectos negativos en plántulas de girasol (*Helianthus annuus* L.) contrario a este reporte (Panou-Filotheou et al., 2001) que encontraron en *Origanum vulgare*, reducción en altura de planta, raíz y superficie laminar por efecto de exceso de cobre.

Aceite esencial. La producción de aceite esencial fue superior en las plantas bajo ambientes estresantes en intensidad moderada e intermedia, esto coincide con (Singh-Sangwan et al., 1994) al reportar que cantidad de aceite esencial se mantiene o aumenta por efecto de estrés como respuestas metabólicas de las plantas. La relación encontrada entre las condiciones de estrés y el aumento en contenido de aceite en las plantas, podría ser atribuida a la disminución de la biosíntesis de metabolitos primarios por efectos del estrés y en consecuencia causar un aumento en la producción de metabolitos secundarios (Naghdi-Badi et al., 2004). Con relación a la mayor producción de aceite esencial en los ambientes bajo inducción de estrés con los elementos Cu^{2+} y Fe^{2+} coincide con Said y Mhamoud, (2010) al encontrar mayor acumulación de aceite esencial con aplicación foliar de hierro en *Ocimum basilicum*, en este mismo sentido (Azis et al., 2010) reportó que con aplicación foliar de hierro y zinc se logró un incremento significativo de aceite en *Cymbopogon citratus* L. El exceso de cobre y hierro causa estrés oxidativo y en consecuencia una respuesta antioxidante debido al incremento de radicales libres, esto incluye mayor actividad de enzimas antioxidantes De Vos y Schat (1992). El efecto de estrés salino inducido en moderada intensidad causó un incremento significativo de aceite en comparación con las condiciones sin inducción de estrés. En *Ocimum basilicum* L. se han reportado cantidades altas de aceite esencial en plantas desarrolladas bajo condiciones de salinidad moderada (Said-Al Ahl y Mahomoud, 2010; Al-Amier et al., 2008; El-Hendawy et al., 2005), sin embargo, otros reportes Said-Al Ahl y Mahomoud (2010) reportan un descenso en la síntesis de aceite por efecto de salinidad en *Origanum vulgare* L. También, (Khorasaninejad et al., 2010) evaluaron la inducción de estrés salino (*Mentha piperita* L.) reportaron bajas producciones de aceite por efecto de salinidad.

Timol y carvacrol. Los resultados mostraron que los constituyentes del aceite esencial, el quimiotipo timol fue dominante sobre el carvacrol, observándose que dentro del mismo ambiente de manejo con la misma concentración mostraron cantidades contrastantes, similar a lo reportado por (Arcila et al., 2004) quien señalo que un incremento en el porcentaje de timol provoca un decremento de carvacrol y viceversa. Aun cuando los valores mas altos de timol y carvacrol se observaron en las condiciones de ambiente con inducción de estrés moderado en Cu y Fe respectivamente, sin embargo, los valores promedio de los ambientes evaluados sin inducción de estrés, fueron significativamente mayores, tal como lo reporto (Gurudatt et al., 2010) al señalar que la expresión de genes en diferentes estados de desarrollo es influenciada por el medio ambiente. Lo observado en los resultados en el ambiente salino, coincide con lo reportado por Said-Al Ahl y Mahomoud (2010) al señalar un decremento de estos metabolitos por efecto de salinidad en *Origanum vulgare* L.

Prolina. La prolina en follaje y raíz se acumuló en mayor medida por efecto de estrés con Fe^{2+} , en cambio en los promedios del factor B los mayores valores de prolina se observaron en las condiciones del ambiente con solo agua lo que revela que *Lippia graveolens* puede comportar como una planta hiperacumuladora de prolina tal como lo reporta (Kavi-Kishore et al., 2005). En la raíz de las plantas, en ambientes estresantes la prolina acumuló cantidades significativamente mayores, observándose, que las plantas expuestas a estas condiciones, exhibieron un desarrollo vegetativo normal y una producción de metabolitos notablemente superior a las obtenidas en las condiciones sin estrés respectivamente. La razón probable es que la prolina actúa como un osmolito regulador ante el estrés oxidativo, actuando como una fuente de reserva de carbono y nitrógeno susceptible de ser utilizada como fuente de energía (Zhang y Verma (1997), además se menciona que la prolina creada bajo estrés inducido por sales, metales y condiciones de deshidratación, no solo es un señalizador en el sistema redox sino también un extintor de eficacia de radicales libres en especies reactivas a oxígeno (Alia y Pardha (1991), en este mismo sentido (Paleget et al., 1984) mencionan, que la actividad de las enzimas catalasa, peroxidasa y polifenoloxidasas fueron originadas por prolina. La estrecha relación entre la producción de aceite esencial y la acumulación de prolina en los ambientes evaluados indica un efecto probable del metabolismo intermedio de la planta que promueve la acumulación de este osmolito como respuesta al estrés oxidativo y en consecuencia la biosíntesis de aceite esencial, tal como lo señala (Paleget et al., 1984) al reportar que la mayor biosíntesis de aceite esencial por estrés inducido con salinidad y iones metálicos, probablemente derivó en actividad enzimática antioxidante que conduce a mayor acumulación de metabolitos secundarios (Lattanzio et al., 2009).

Los efectos de los ambientes estresantes evaluados indujeron cambios en el metabolismo de las plantas que derivaron en una mayor biosíntesis de aceite esencial y consecuentemente mayor cantidad de timol y carvacrol.

REFERENCIAS

- Adams, R.P. (1995). Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy; Allured Publishing Corp., Carol Stream, IL
- Ahmed, Ch.B., B.B Rouna, S. Sensoy, M. Boukhriss, y, F. B. Abdullah (2009). Saline Water Irrigation Effects on Antioxidant Defense System and Proline Accumulation in Leaves and Roots of Field-Grown Olive. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57:11484–11490
- Ahmed, C.B., B.B Rouna, S. Sensoy, M. Boukhriss y. F. B. Abdullah (2010). Exogenous Proline Effects on Photosynthetic Performance Antioxidant Defense System of Young Olive Tree. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 58: 4216–4222
- Alia- Pardha y P. Saradhi, (1991). Proline accumulation under heavy metal stress. *J. Plant Physiol.* **138**: 554–558.
- AOAC (1990). Official Methods of the AOAC. International 15th Ed. Association Official Agricultural Chemists, Arlington, Va., U.S.A.
- Arzila-Lozano, C.C, G. Loarca- Piña, S. Lecona-Urbe, E. Gonzales (2004). El Oregano: Propiedades, Composición y Actividad Biológica de sus Componentes. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. Vol.54 (1) 100-111
- Aziz, E.E., Al- Amir y J.e. Craker. 2008. Influence of sal stresses grown and essential production in peppermint pennyroyal. And apple mint. *Journal Herbs, Species and Medicinale. Plantas* 14(1/2):77-87
- Aziz, E. E., A. A. El Din, E. E.A. Omer, (2010). Influence of Zinc and Iron on Plant Growth and Chemical Constituents of *Cymbopogon citratus* L. Grown in Newly Reclaimed Land. *International Journal of Academic Research* vol. 2.no. 4.
- Bates, L.Waldren RP y Teare ID(1973). Rapid determination of free proline of water stress studies. *Plant Soil*. 39: 205- 207
- Benavides MA, Ramirez RH, Robledo TV, Mati R, Cornejo OE, Hernandez DJ, Sandoval RA, Mendoza VR, Samaniego CE, Ramirez MJG, Bacopulos Tellez E, Aguilera CA, Fuentes LO.

(2002). Ecofisiología y bioquímica del Estrés en Plantas. Primera ed. Departamento de Horticultura Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Saltillo Coahuila

Chartzoulakis, K, M. Loupassaki, M. Bertaki y I. Androulakis (2002). Effects of NaCl salinity on growth, ion content and CO₂ assimilation rate of six olive cultivars. *Science . Horticola.*, 96: 235–247

Da Silva, E.C., F. De Araújo, F. De Melo y A.De Azevedo, (2008). Physiological responses to salt stress in young umbu plants. *Environmental & Experimental Botany* Vol. 63:147-157

De Vos, C.H.R. y H. Schat (1992). Free radical and heavy metal tolerance. In: Rozema, J., Verkleji, J.A.C. (Eds.), *Ecological Response to Environmental Stress*. Kluwer, Dordrecht, pp. 22–30.

El-Hendaway, S.E., Y. Hu, G.M. Yakout, A.M. Awad, S.E. Hafizand y U. Schmidhalter, (2005). Evaluating salt tolerance of wheat genotypes using the multiple parameters. *European Journal . Agronomy*. 22: 243-253

Gantet, P., y J. Memelink (2002). Transcription factors: tools to engineer the production of pharmacologically active plant metabolites. *Trends Pharmacol Science*. 23(12):563-569

Gurudatt, P. S., V. S. Pruti, B.T. Shwetass, Ramesha, G. Ravikanth y R.Vasudeva (2010). Changes in the essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L. during annual growth from Kumaon Himalaya. **Current Science**, Vol. 98: 8- 25

Kavi- Kishor, P.B, S. Sangami, R.N. Amarutha, P. Sri Laximi, K.R.S. Naidu, S.Ra, K.J Reddy, P. Theriappan y N. Sreenivasulu. (2005). Regulation of proline biosynthesis, degradation, uptake and transport in higher plants: Its implications in plant growth and abiotic stress tolerance. *Current Science*, 88: NO. 3

Kessmann, H., C.Hofmann, T.Maetzke, J. Herzog, E.Ward, S.Theo, S.Uknes, y J. Ryals, (1994). Induction of Systemic Acquired Disease Resistance in Plants by Chemicals. *Annual Review of Phytopathology*, Vol. 32: 439 -459

Khorasaninejad S, Mousav A, Soltanlo H, Hemmati K, Khalighi A. 2010. The Effect of Salinity Stress on Growth Parameters, Essential oil Yield and Constituent of Peppermint (*Mentha piperita* L.) *World Applied Sciences Journal* 11 (11): 1403-1407

Kirbag, FZ, y S Kirbag, (2007) Effects of copper on chlorophyll, proline, protein and abscisic acid level of sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings. *Journal of Environmental Biology*. 28(3) 561-566 (2007)

Khurana, N., M.V. Singh y C. Chatterjee (2006). Copper Stress Alters Physiology and Deteriorates Seed Quality of Rapeseed. *Journal of Plant Nutrition*, 29: 93–101

Lattanzio V., A. Crdinali, Ruta C. y F. Morone.(2009). Relationship of secondary metabolism to growth in oregano(*Origanumvulgare*L.) shoot cultures under nutritional stress. *Environmental and Experimental Botany* 65: 54–62

Maggio A., S. Miyasaki, P. Veronese, T. Fujitas, J.A. Ibeas, B. Damsz, M.L,Narasimhan P.M Hasegawa, R.J Joly y R.A Bressan (2002). Does proline accumulation play an active role in stress-induced growth reduction? *The Plant Journal* 31(6), 699±712

Martins, L.L., y P.Mourato (2006).Effect of Excess Copper on Tomato Plants: Growth Parameters, Enzyme Activities, Chlorophyll, and Mineral Content. *Journal of Plant Nutrition*, 29: 2179–2198

McLafferty F.W. (1989). *Wiley Registry of Mass Spectral Data*, 5a ed.;Wiley: New York.

Mangel, K. y E.A. Kirkby (2001). *Principles of plant nutrition*. **5th ed.**. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. (hardback 849 pp).

- Munns, R y M. Tester (2008) Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review Plant Biology*. 59: 651–681.
- Naghdi-Badi, H., Yazdani, D.A.S. Mohammad y F. Nazari (2004). Effects of spacing and harvesting on herbage yield and quality/quantity of oil in thyme, *Thymus vulgaris* L. *Industrial Crop Production*. 19: 231–236.
- Neena K. M, V. Singh y C. Chatterjee (2006). Copper Stress Alters Physiology and Deteriorates Seed Quality of Rapeseed. *Journal of Plant Nutrition*, 29: 93–101
- Olivares, S. E (1989). Paquete de diseños experimentales FAUNL. Versión 1.4. Facultad de agronomía UANL. Marín, N.L. México. Autónoma de Nuevo León Facultad de Ciencias Biológicas. San Nicolás de los Garza, N.L., México. 77 P
- Panou-Filotheou, H., AM Bosabalidis, and S. Karataglis. 2001. Effects of copper toxicity on leaves of oregano (*Origanum vulgare* subsp. *hirtum*). *Annals of Botany*. 88: 207-214
- Pardossi, A., F., D. Malorgio, R. Oriolo, G. Gucci, Serra y F. Tognoni (1998). Water relations and osmotic adjustment in *Apium graveolens* during long-term NaCl stress and subsequent relief. *Physiologia plantarum*. 102: 369-376
- Paleg, L.G., G. R. Steward, y J. W. Bradbeer (1984). Proline and glycine betaine influence protein solvation. *Plant Physiology*, 75: 974–978
- Psarras, G., M. Bertaki y K. Chartzoulakis (2008). Response of greenhouse tomato to salt stress and K⁺ supplement. *Plant Biosystems*. 142: 149-153
- Russo M, Galletti GC, Bocchini P, Carnacini A. (1998). Essential oil chemical composition of wild populations of Italian oregano spice (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart): A preliminary evaluation of their use in chemotaxonomy by cluster analysis. 1. Inflorescences. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 46: 3741-3746.

- Said-Al Ahl, H.A.H., E.A. Omer (2009). Effect of spraying with zinc and / or iron on growth and chemical composition of coriander (*Coriandrum sativum* L.) harvested at three stages of development. *Journal Medicinal Food Plants* 1: 30-46
- Said-Al Ahl, H.A.H., A. A. Mhamoud, (2010). Effect of zinc and / or iron foliar application on growth and essential oil of sweet basil (*Ocimum basilicum* L.) under salt stress. *Ocean Journal of Applied Sciences* 3: 97-110
- Said-Al Ahl, H.A.H. y M.S. Hussein, (2010). Effect of water stress and potassium humate on the productivity of oregano plant using saline and fresh water irrigation *Ocean Journal of Applied Sciences* 3: 125- 141
- Stohs, S. J. y D. Bagchi, (1995). Oxidative Mechanisms in the Toxicity of Metal Ions Free Radical *Biol. & Medicine* 18(2):321-336.
- Singh-Sangwan, N., A.H.A. Farooqif, y R. Singh- Sangawan, (1994). Effect of drought stress on growth and essential oil metabolism in lemongrasses. *New phytologist* 123: 173- 179
- Sivropoulou, A., E. Papanikolaou, C. Nikolaou, S. Kokkini, T. Lanaras y M. Arsenakis, (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of *Origanum* essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 44: 1202-1205.
- Xing W., H Wenming y G Liu (2010). Effect of excess iron and copper on physiology of aquatic plant *Spirodela polyrrhiza* (L.) Schleid. *Environmental Toxicology*. Vol 25 (2) p 103- 112
- Zhang, C-S., Lu, Q. and Verma, D. P. S. 1997. Characterization of D1-pyrroline-5-carboxylate synthetase gene promoter in transgenic *Arabidopsis thaliana* subjected to water stress. *Plant Science*. 129, 81–89.